

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALESSANDRA MELO DE AGUIAR

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO EM
LINHAGENS MESENQUIMAIS DE PERICITOS CARDÍACOS HUMANOS

Curitiba

2011

ALESSANDRA MELO DE AGUIAR

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO EM
LINHAGENS MESENQUIMAIS DE PERICITOS CARDÍACOS HUMANOS

Tese apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular,
Departamento de Biologia Celular e
Molecular, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientadores:

Prof. Dr. Samuel Goldenberg

Prof. Dr. Alejandro Correa

Curitiba

2011

Aguiar, Alessandra Melo de
Isolamento, caracterização, ativação e diferenciação em linhagens
mesenquimais de pericitos cardíacos humanos. / Alessandra Melo de
Aguiar. – Curitiba, 2011.
146 f.: il. color. ; 30cm.

Orientador: Samuel Goldenberg

Orientador: Alejandro Correa

- 1 Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.
- 2 1. Fosfatase alcalina 2. Células-tronco mesenquimais I. Título II.
Goldenberg, Samuel III. Correa, Alejandro IV. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Prof. Dr. Samuel Goldenberg
Orientador e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas - ICC

Prof. Dr. Lindolfo da Silva Meirelles
Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto - USP

Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dr. Juliano Bordignon
Instituto Carlos Chagas - ICC

E tendo como suplentes,

Profa. Dra. Fabíola Barbieri Holetz
Instituto Carlos Chagas - ICC

Profa. Dra. Flávia Sant'Anna Rios
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após argüir a doutoranda **Alessandra Melo de Aguiar**, em relação ao seu trabalho intitulado: **"Isolamento, caracterização, ativação e diferenciação em linhagens mesenquimais de pericitos cardíacos humanos"** são de parecer favorável à... **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de DOUTOR em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de novembro de 2011

Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

Dedico esse trabalho a minha família, Fabio e Felipe.

Em nosso 5º aniversário de casamento e 7º mês de
gestação.

Por estarem junto na rotina de trabalho e de estudos.

Por reconhecerem a importância desta etapa para minha
realização pessoal.

Por me fazerem a pessoa mais feliz do mundo,
amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a família e aos amigos. Apesar de ausente, era em vocês que buscava forças para continuar e motivação para o trabalho.

Aos Orientadores, Samuel Goldenberg e Alejandro Correa, por sempre apoiarem o projeto de pesquisa e me guiarem no melhor caminho a seguir.

Ao Bruno Dallagiovanna, meu chefe, por me dar liberdade e apoio para realizar este projeto de pesquisa e sempre delegar tarefas e confiar em mim.

Ao Dr. Marco Augusto Stimamiglio pelas valiosas sugestões, discussões e revisão da tese.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco, LABCET, pelo companheirismo e apoio incondicional: Crisciele Kuligovski, Axel Cofré, Patrícia Shigunov, Jaiesa Zych, Andressa Schittini, Ana Paula Abud, Ana Carolina Origa, Anny Robert, Guillia Millano e a todos os amigos do Instituto Carlos Chagas.

Ao pessoal do Banco de Homoenxertos da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba por todo apoio necessário e fornecimento das amostras biológicas para realização deste trabalho.

A equipe do Programa de Pos-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, em especial Marlene, aos coordenadores do curso e a todo colegiado.

A toda a equipe do Núcleo de Tecnologia Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em especial Alexandra Senegaglia, Carmen Rebellato, Paula Hansen, Fabiane Barchick e ao Dr. Paulo Brofman pela participação neste projeto.

Ao pessoal técnico, administrativo e de manutenção do Instituto Carlos Chagas, que forneceram as condições físicas e materiais para realização deste trabalho. As agências de fomento e fontes financiadoras desse projeto: Cnpq, Fiocruz, Fundação Araucária.

"They did not know it was impossible, so they did it!".
Jean Cocteau (1889 – 1963).

RESUMO

Células residentes teciduais são atualmente identificadas como populações de células progenitoras promissoras para terapias celulares. Neste trabalho, foi realizado o isolamento de células cardíacas humanas que expressam a enzima fosfatase alcalina, e estas células apresentaram características de célula-tronco mesenquimais (CTM). Foram utilizadas amostras de 24 doadores cadavéricos provenientes do Banco de Homoenxertos Humanos da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba. O tempo médio de isquemia total foi de $21,5 \pm 9,1$ h. A taxa de sucesso para o isolamento de células cardíacas humanas obtidas pela cultura de explantes foi de 70% para a aurícula direita (14/ 20) e 33% para o ventrículo direito (7/ 21). Células totais derivadas de aurícula (TAD) foram usadas para a purificação de células positivas para a fosfatase alcalina (ALPL+) pois A população derivada de aurícula pode ser uma fonte mais adequada de células cardíacas do que o ventrículo direito pois além de apresentar maior quantidade de células positivas para a fosfatase alcalina, seu sucesso de isolamento é maior. Por essa razão, nos ensaios posteriores foram utilizadas células derivadas de aurícula. Foi observada a expressão de marcadores de células perivasculares e CTM e também a diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condroblastos. Os transcritos de marcadores de diferenciação são expressos em níveis mais altos quando comparados aos controles induzidos em células ALPL+. Ambas as populações de células expressaram mRNA de alguns marcadores de células progenitoras cardíacas, como GATA4, CD117 e VEGF e as células ALPL+ expressaram também troponina T e ABCG2 da linhagem cardíaca. Quando induzidas a diferenciação em cardiomiócitos há expressão de GATA4, com localização nuclear aumentada. Desta forma, as amostras de tecido cardíaco provenientes de banco de tecidos podem ser consideradas como fontes de MSC com “bias” cardíaco, possivelmente comprometidas com a linhagem cardíaca, mesmo após tempos de isquemia prolongada.

Palavras-chave: fosfatase alcalina, células-tronco mesenquimais, pericitos, coração, diferenciação celular.

ABSTRACT

Tissue-specific resident cells have been identified as a promising population of progenitor cells for cell-based therapies. We describe here the isolation from adult human hearts of tissue nonspecific alkaline phosphatase-positive cells (ALPL+ cells) with mesenchymal stem cell (MSC) characteristics. Samples from 24 adult cadaveric donors were obtained from a valve bank. Mean total ischemia time was 21.5 ± 9.1 hours. The success rate for the isolation of human heart-derived cells by the explant culture technique was 70% for the right auricle (14 of 20 trials) and 33% for the right ventricle (7 of 21 trials). The total auricle-derived cell population (TAD) was used for the purification of ALPL+ cells. TAD and ALPL+ cells expressed markers for MSC and pericytes. TAD cells and ALPL+ cells differentiated into adipocytes, osteoblasts and chondroblasts, and ALPL+ cells expressed markers of these three lineages more strongly than TAD cells, as shown by RT-PCR. This population therefore has a greater potential for differentiation into mesenchymal lineages than TAD cells. Both cell populations express transcripts of some markers of cardiac progenitors, such as GATA4, CD117 and VEGF. ALPL+ cells expressed troponin T and ABCG2, which are also markers of the cardiac lineage. Nuclear expression of GATA4 protein is increased after induction of cardiomyocyte differentiation. Heart samples from tissue banks could be considered as sources of MSC with putative commitment towards cardiac lineages, even after prolonged ischemia times.

Keywords: Alkaline phosphatase; mesenchymal stem cell; pericyte; heart; cell differentiation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Esquema do isolamento de células cardíacas humanas pelo método de cultura de explantes.	14
FIGURA 2 - Esquema do isolamento de células cardíacas humanas pelo método de cultura de explantes. Os fragmentos de tecido cardíaco humano foram dissociados mecanicamente com uso de bisturi (a), em seguida foram transferidos para frascos de cultura (b) e o meio de cultura foi adicionado (c). O frasco de cultura contendo os explantes cardíacos foi incubado invertido (d) por 30 a 60 min em estufa a 36,5°C e atmosfera de 5% de CO ₂ (e). O frasco de cultivo era virado para a posição de cultivo e seguiam-se trocas de meio de cultura parciais semanais (f).	18
FIGURA 3 - Esquema do isolamento de células cardíacas humanas pelo método de dissociação enzimática. Os fragmentos de tecido cardíaco humano foram dissociados mecanicamente com uso de bisturi, em seguida foram lavados em solução salina balanceada e transferidos para frascos de dissociação enzimática, com diferentes combinações de enzimas por 1 a 3 ciclos de 30 a 60 minutos a 37°C. A suspensão celular obtida era filtrada em rede com poros de nylon de 40 µm e então submetida ao gradiente de densidade Histopaque e as células das frações do anel e do precipitado foram então analisadas quanto a viabilidade e plaqueadas em frascos de cultura e seguiam-se trocas parciais de meio de cultivo semanalmente.	20
FIGURA 4 - Esquema da dissociação enzimática: suspensão celular e gradiente de Histopaque.	45
FIGURA 5 - Comparativo isolamento celular: Explante x dissociação enzimática.	46
FIGURA 6 - Isolamento de células cardíacas humanas pelo método de cultura de explantes.	47
FIGURA 7 - Taxa de sucesso de isolamento de células cardíacas humanas.	48
FIGURA 8 - Caracterização de células derivadas de aurícula e ventrículo por RT-PCR.	49
FIGURA 9 - Caracterização de células derivadas de aurícula e ventrículo por citometria de fluxo.	50
FIGURA 10 - Padrão de Proteínas em extratos de células cardíacas humanas.	51
FIGURA 11 - Expressão de ALPL por Western Blot.	52
FIGURA 12 - Atividade <i>in situ</i> de fosfatase Alcalina em células cardíacas humanas.	52
FIGURA 13 - Purificação de células positivas para ALPL com uso de micropérolas magnéticas.	53
FIGURA 14 - Imunofenotipagem das células cardíacas humanas.	54
FIGURA 15 - Diferenciação em linhagens mesenquimais.	55
FIGURA 16 - Diferenciação em linhagens mesenquimais por citoquímica e q-PCR.	56

FIGURA 17 - Quantificação da diferenciação adipogênica.	57
FIGURA 18 - Expressão de marcadores cardíacos.	58
FIGURA 19 - Formação de dutos em cultura de Matrigel™ amostras TAD.	61
FIGURA 20 - Formação de dutos em cultura de Matrigel™ amostras ALPL-.	62
FIGURA 21 - Formação de dutos em cultura de Matrigel™ amostras ALPL+.	63
FIGURA 22 - Expressão de GATA4, doador 1.	65
FIGURA 23 - Expressão de GATA4, doador 2.	66
FIGURA 24 - Expressão de GATA4, doador 3.	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Enzimas utilizadas para dissociação enzimática	18
TABELA 2 - Comparativo do isolamento celular entre dissociação enzimática e cultura de explante.	44
TABELA 3 - Taxa de sucesso no isolamento de células cardíacas para 24 amostras neste estudo.	47
TABELA 4 - Ensaio de formação de dutos em Matrigel TM	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALPL	- fosfatase alcalina tecido não específica
ALPL+	- células positivas para fosfatase alcalina tecido não específica
APC	- Aloficocianina (<i>allophycocyanin</i>)
BCIP	- p-toluidina 5-bromo-4-cloro-indolilfosfato (<i>5-bromo-4-chloro-3-</i>
BHSC	- Banco de Homoenxertos da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba
BSA	- Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
BSS	- Solução salina balanceada (<i>Balanced salt solution</i>)
BSS-CMF	- Solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio (<i>Balanced salt solution, calcium and magnesium free</i>)
cDNA	- ácido desoxirribonucleico complementar (<i>complementary desoxiribonucleic acid</i>)
CO ₂	- gás carbônio ou dióxido de carbono
CTM	- Célula-tronco mesenquimal (Mesenchymal stem cell - MSC)
CVML	- Célula vascular de músculo liso
DAPI	- 4',6'-diamidino-2 fenilindol (<i>4'-6-diamidine-2-phenyl indole</i>)
DEPC	- dietilpirocarbonato
DMEM	- Meio de cultura eagle com modificação de dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNA	- ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	- desoxirribonuclease
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
ESC	- Células-tronco embrionárias (ESC- <i>embryonic stem cells</i>)
EUA	- Estados Unidos da América
FGF-b	- fator de crescimento de fibroblasto, básico (<i>Fibroblast growth factor, basic</i>)
FITC	- isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
Gapdh	- gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
kb	- 1000 nucleotídeos em RNA ou 1000 pares nucleotídeos em DNA
mRNA	- ácido ribonucleico mensageiro (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
NaOH	- hidróxido de sódio
NBT	- cloreto de nitroazul de tetrazólio (<i>nitro blue tetrazolium</i>)
OMS	- Organização Mundial da Saúde
pb	- pares de base
PBS	- solução salina fosfatada tamponada (phosphate buffer solution)
PCR	- reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	- Ficoeritrina (<i>Phycoerythrin</i>)
PFA	- paraformaldeído
q-PCR	- PCR quantitativo (<i>quantitative PCR</i>)
RNA	- ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	- ribonuclease
RT-PCR	- reação em cadeia da polimerase acoplada à transcrição reversa (<i>reverse transcription associated to polymerase chain reaction</i>)

SBF	- soro fetal bovino
SDS	- dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
TAD	- população total de células cardíacas derivadas de aurícula
TGF- β	- fator de crescimento transformante beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
Tris	- hidroximetil aminometano (hydroxymethyl aminomethane)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- percentual
μL	- microlitro
μm	- micrometro
cm ²	- centímetro quadrado
g	- grama
h	- hora(s)
Da	- Dalton
M	- molar ou mol/L
Mb	- 1000 kb
mg	- miligrama
mg/mL	- migrama por mililitro
min.	- minuto(s)
mL	- mililitro
mM	- milimolar
mm ³	- milimitro cúbico
ng	- nanograma
ng/mL	- nanograma por mililitro
°C	- graus celsius
p	- significância
pH	- potencial hidrogeniônico
pmol	- picomolar
rpm	- rotações por minutos
U/mL	- Unidades por mililitro
UI/mL	- unidades internacionais por mililitro

SUMÁRIO

1	Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.....	3
2	1. Fosfatase alcalina 2. Células-tronco mesenquimais I. Título II. Goldenberg, Samuel III. Correa, Alejandro IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.....	3
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	IMPACTO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	1
1.2	CÉLULAS-TRONCO.....	2
1.3	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	4
1.4	CÉLULAS PERIVASCULARES: PRECURSORES MULTIPOTENTES.....	6
1.5	TERAPIA CELULAR PARA DOENÇAS CARDIOVASCULARES E CÉLULAS-TRONCO RESIDENTES CARDÍACAS.....	9
1.6	FOSFATASE ALCALINA COMO MARCADOR DE CÉLULAS-TRONCO....	10
2	JUSTIFICATIVA.....	12
3	OBJETIVOS.....	13
3.1	OBJETIVO GERAL.....	13
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1	FLUXOGRAMA.....	14
4.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	15
4.3	COLETA DO TECIDO CARDÍACO.....	15
4.4	ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS.....	16
4.4.1	Dissociação tecidual.....	16
4.4.2	Cultura de explantes.....	16
4.4.3	Dissociação Enzimática.....	18
4.5	MANUTENÇÃO E REPIQUE CELULAR.....	20
4.6	PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA A FOSFATASE ALCALINA.....	21
4.6.1	Purificação celular com uso de micropérolas magnéticas.....	21
4.6.2	Purificação celular com uso de citometria de fluxo.....	24

4.7	CARACTERIZAÇÃO CELULAR.....	26
4.7.1	Análise da expressão de fosfatase alcalina pelas células cardíacas humanas.....	26
4.7.1.1	Preparo de extrato protéico de células cardíacas humanas	26
4.7.1.2	Eletroforese em gel de proteína (SDS-PAGE)	27
4.7.1.3	Ensaio de Western Blot.....	27
4.7.1.4	Avaliação da atividade <i>in situ</i> de fosfatase alcalina	28
4.7.2	Análise da expressão gênica.....	29
4.7.2.1	Extração de RNA	29
4.7.2.2	Síntese de c-DNA	30
4.7.2.3	Iniciadores.....	31
4.7.2.4	RT-PCR.....	31
4.7.2.5	q-PCR	32
4.7.3	Caracterização celular por imunomarcação	33
4.7.3.1	Imunofenotipagem de antígenos de superfície	34
4.7.3.2	Imunofenotipagem para antígenos intracelulares	34
4.7.3.3	Imunofluorescência	35
4.8	POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS EM LINHAGENS MENSEQUIMAS	36
4.8.1	Diferenciação adipogênica	37
4.8.2	Diferenciação osteogênica	38
4.8.3	Diferenciação condrogênica	40
4.9	POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS EM CARDIOMIÓCITOS	41
4.9.1	Indução por 5 Azacitidina, TGF- β 1 e vitamina C	41
4.9.2	Diferenciação celular induzida por 5-azacitidina.....	42
4.10	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE TÚBULOS CAPILARES <i>IN VITRO</i>	42
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS	43
5.1	PADRONIZAÇÃO DO ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS	43
5.2	ISOLAMENTO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS PELA TÉCNICA CULTURA DE EXPLANTE	46

5.3	CÉLULAS DERIVADAS DE AURÍCULA E CÉLULAS DERIVADAS DE VENTRÍCULO SÃO HETEROGÊNEAS E EXPRESSAM, ENTRE OUTROS, MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	49
5.4	Expressão de fosfatase alcalina pelas células cardíacas humanas.....	51
5.5	Purificação de células ALPL+ com o uso de micropérolas magnéticas.....	53
5.6	Células ALPL+ possuem as características e potencial de diferenciação semelhante à MSC.....	53
5.7	Expressão de marcadores cardíacos e possível comprometimento com linhagem cardíaca.....	57
5.8	Separação celular por citometria de fluxo	58
5.9	Formação de dutos endoteliais em Matrigel™	59
5.10	Indução da diferenciação em cardiomiócitos	64
6	DISCUSSÃO.....	68
7	CONCLUSÕES.....	72
8	PERSPECTIVAS	73
	REFERÊNCIAS.....	75
	BIANCO, P. Back to the future: moving beyond "mesenchymal stem cells". Journal of Cellular Biochemistry , Malden, v. 112, n. 7, p. 1713-21, 2011.....	76
	APÊNDICES.....	86
	ANEXOS	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 IMPACTO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares são causadas por desordens no coração e/ou vasos sanguíneos. Entre as principais manifestações destacam-se a doença coronariana que ocasiona ataques cardíacos, acidente vascular cerebral, hipertensão e doenças circulatórias periféricas, entre outras (WORLD HEALTH ORGANIZATION., 2007a).

Apesar de medidas preventivas visando redução do risco cardiovascular como o combate a obesidade, estímulo a prática de exercícios físicos e o combate ao tabagismo os dados não são alentadores. A Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION., 2007a) estimou que 17,5 milhões de pessoas morreram em 2005 por doenças cardiovasculares, representando cerca de 30% das mortes em todo o mundo. Apenas os ataques cardíacos foram responsáveis por aproximadamente 7,6 milhões de óbitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION., 2007b) com previsão de incremento no índice de mortalidade até 2015.

Dados do Brasil indicaram que 31,88% dos óbitos no ano de 2007 foram devidos a complicações do aparelho circulatório, correspondendo a 308.466 mortes, dos quais 92.568, ou seja, cerca de 30% dos óbitos foram causadas por doença isquêmica do coração (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Embora as medidas preventivas sejam estimuladas e disseminadas, o número de pessoas acometidas por doenças cardiovasculares é crescente. Segundo dados obtidos com a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios, realizada em 2003, 3,61% dos brasileiros declarou ter doença do coração, representando em torno de 7 milhões de pessoas (BALBINOTTO NETO E SILVA, 2008). O tratamento farmacológico é o mais indicado, contudo nos casos de insuficiência cardíaca grave, a reposição do tecido danificado ocorre por meio de transplante cardíaco. No Brasil, atualmente existem

257 pessoas na fila de transplante cardíaco enquanto que em 2010 foram realizados 168 procedimentos no país (SUS, 2011). Desta forma, as doenças cardiovasculares representam uma questão de saúde pública nacional e mundial.

Além de causar óbitos precoces, as doenças cardiovasculares diminuem a qualidade de vida dos pacientes e representam um grande impacto social e econômico por comprometer pessoas na fase mais produtiva da vida. Conseqüentemente, alternativas para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares são cada vez mais pesquisadas em todo o mundo através da pesquisa de novas terapias, como a terapia celular com o uso de células-tronco.

1.2 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são estudadas por seu potencial de aplicação em terapias celulares e medicina regenerativa. As características que tornam as células-tronco a grande aposta de aplicação terapêutica, no que é hoje chamada de medicina regenerativa, são principalmente a capacidade de autorrenovação e de originar tipos celulares com funções específicas. Desta forma, as células-tronco são avaliadas quanto a possibilidade de seu uso para repor células e tecidos danificados ou doentes (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2001).

Contudo, a capacidade de proliferação e potencial de diferenciação celular são limitados de acordo com o tecido onde as células-tronco se encontram e estas características têm implicação direta na possível aplicação terapêutica. Didaticamente, as células-tronco são classificadas como totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Podem ser encontradas nos embriões e em tecidos adultos. Além disso, recentemente foram descritas metodologias de obtenção de células com características de células-tronco embrionárias a partir de células somáticas.

As células tronco presentes no zigoto são chamadas de totipotentes pois são capazes de originar todos os tipos celulares presentes num organismo, incluindo os anexos embrionários. A medida que ocorrem as divisões celulares no embrião, muitas células se tornam determinadas a se diferenciarem em tipos celulares

específicos e perdem a capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares. Por exemplo, as células classificadas como pluripotentes, são capazes de originar populações celulares derivadas dos 3 folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma), contudo não originam os anexos embrionários (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2001).

Exemplos de células pluripotentes que foram produzidas através de manipulação de embriões ou células somáticas são as células-tronco embrionárias e as células-tronco induzidas. As células-tronco embrionárias (ESC-*embryonic stem cells*) são células derivadas da massa celular interna de embriões e foram primeiramente descritas em camundongos em 1981 (EVANS E KAUFMAN, 1981) e isoladas a partir de embriões humanos em 1998 (THOMSON, ITSKOVITZ-ELDOR *et al.*, 1998), sendo que a primeira linhagem de células embrionárias humanas isolada no Brasil foi em 2008 (FRAGA, SUKOYAN *et al.*, 2011). As células-tronco embrionárias podem ser mantidas e expandidas em estado indiferenciado *in vitro* ou induzidas a diferenciação em tecidos provenientes dos 3 folhetos embrionários. Desta forma, tem um grande potencial terapêutico. Contudo, questões técnicas ainda devem ser avaliadas, como o potencial dessas células em gerarem tumores quando injetadas em animais (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2006), o que direcionou as pesquisas pré-clínicas com células pré-diferenciadas obtidas a partir de células embrionárias e não o uso destas células sem uma prévia diferenciação (KEIRSTEAD, NISTOR *et al.*, 2005). Além disso existem também as questões éticas, pois é necessário destruir embriões humanos para sua geração, o que causa muitos questionamentos no campo ético, político e legal. No Brasil existe legislação específica sobre o tema, a Lei de Biossegurança no. 11.105 de 25 de Março de 2005.

Uma alternativa seria também o uso de células-tronco induzidas, onde células somáticas são induzidas a fenótipo e características semelhantes a de células-tronco embrionárias, sem contudo ser necessária a destruição de embriões para sua geração, conforme descrito (TAKAHASHI, OKITA *et al.*, 2007). Contudo, estas células apresentam as limitações técnicas das células tronco embrionárias quanto ao potencial de formação de teratomas quando injetadas em animais. Além disso, para produzi-las é necessário reprogramar a expressão gênica, através de fatores indutores com o uso de vetores virais ou proteínas (KEIRSTEAD, Nistor *et al.*, 2005).

Desta forma, a utilização de células-tronco induzidas também apresenta limitações técnicas relativas a segurança de utilização deste tipo celular em terapias, conforme revisto (STADTFELD E HOCHEDLINGER, 2010).

As células-tronco adultas são encontradas em tecidos não embrionários e são células não diferenciadas que estão presentes em tecidos especializados, capazes de se autorrenovar e dar origem a células especializadas que compõe aquele tecido durante toda a vida do indivíduo. Além disso, é sabido que células-tronco residentes teciduais atuam na renovação dos órgãos e tecidos e participam da homeostasia normal de um indivíduo, como as células-tronco epiteliais, tanto da pele quanto do epitélio intestinal, células satélite que dão origem a células de músculo esquelético, entre outras e que também vem sendo avaliadas para uso em terapias (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2006).

Normalmente a célula-tronco adulta dá origem a células progenitoras ou precursoras, que então proliferam e se diferenciam em células maduras com funções especializadas. Em clínica já são conhecidas e utilizadas há muitas décadas as células-tronco hematopoéticas que dão origem as células sanguíneas e são utilizadas em transplante de medula óssea para o tratamento de doenças hematológicas. De fato, as principais características das células tronco: autorrenovação e capacidade de diferenciação em células especializadas, foram definidas em estudos com células hematopoéticas de murinos em 1960 conduzidos por Till e McCulloch (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2001).

1.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A partir de medula óssea foram identificadas células com capacidade de diferenciação em outros tecidos que não o hematopoético. Conforme relatado em várias referências (BIANCO, 2011, WONG, 2011), datam de 1968 estudos conduzidos por Tavassoli e Crosby onde essa capacidade foi observada com a formação de osso em experimentos de transplante *in vivo* em murinos a partir de

medula óssea. Posteriormente, foi atribuído por Friedenstein e colaboradores na década de 1970 a capacidade que as células aderentes não hematopoéticas que compõem o estroma da medula óssea de originar osso, mesma característica atribuída a células aderentes clonais derivadas de medula óssea. A ideia de que as células clonogênicas estromais presentes na medula óssea constituíam células-tronco distintas das células-tronco hematopoéticas foi estabelecida por Friedenstein e colaboradores com base em observações de transplante heterotrópicos. Foi observado que células clonogênicas eram capazes de gerar uma variedade de células: osteoblastos, condrócitos, adipócitos e fibroblastos. Estes experimentos e outros provaram a multipotencialidade de células estromais de medula óssea e sua capacidade para gerar tecidos diferenciados, com base em ensaios de transplante *in vivo*, sem qualquer estímulo prévio ao transplante. Os achados de Friedenstein foram comprovados *in vitro* (PITTENGER, MACKAY *et al.*, 1999) revisado por (CHAMBERLAIN, FOX *et al.*, 2007) e segundo os autores, as células isoladas pelo método de Friedenstein seriam multipotentes e capazes de diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e até miócitos. Em 1991, Caplan utilizou o termo células-tronco mesenquimais para as células presentes na medula óssea com potencial de diferenciação em outras linhagens de origem mesodermal que não as linhagens hematopoéticas, conforme revisado (WONG, 2011).

Com esse potencial de diferenciação em tipos celulares com possível aplicação em terapias celulares, as células tronco-mesenquimais vem sendo largamente estudadas por diversos grupos e diversas metodologias, desde o isolamento até a caracterização, o que dificulta a comparação entre os estudos. Desta forma, o Comitê Internacional de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais (*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee*) da Sociedade Internacional para Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*) propuseram os critérios mínimos para definir células-tronco mesenquimais humanas, conforme descritos por Dominici e colaboradores em 2006 (DOMINICI, LE BLANC *et al.*, 2006). Assim as células-tronco mesenquimais devem ser aderentes ao plástico em condições padrão de cultivo; devem expressar os marcadores CD105, CD90 e CD73 e não expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR e finalmente, devem diferenciar-se em osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro*. Vários estudos demonstraram essas características das células-tronco mesenquimais com potencial de

diferenciação em adipócitos, osteblastos e condrócitos (GIMBLE E GUILAK, 2003; REBELATTO, AGUIAR *et al.*, 2008) e em cardiomiócitos. (MAKINO, FUKUDA *et al.*, 1999, TOMITA, MAKINO *et al.*, 2007, (TOMA, PITTENGER *et al.*, 2002).

De uma forma geral, o uso clínico de células-tronco mesenquimais é bem debatido e revisto em literatura. Existem exemplos de ensaios clínicos de fase I ou II com uso de células-tronco mesenquimais para vários tipos de doenças, como derrame, infarto agudo do miocárdio e leucemia, além de vários estudos em animais para tratamento de doenças hepáticas, renais e reparo de epitélio intestinal (revisto por OTTO & WRIGHT, 2011). Contudo, apesar dos vários estudos indicando que as células-tronco mesenquimais podem ser utilizadas em tratamentos de diversas doenças, medidas de controle e segurança devem ser levados em conta, uma vez que pode ocorrer transformação maligna em função de longo tempo de cultura e manipulação genética (revisto por WONG, 2011)

Além disso, outras fontes de células-tronco mesenquimais foram definidas como tecido adiposo (Zuk, Zhu *et al.*, 2002), sangue de cordão umbilical (ROGERS e CASPER, 2004), tecido cardíaco (BELTRAMI, CEsSELLi *et al.*, 2007; CRISAN, YAP *et al.*, 2008), abrindo assim a perspectiva de que apesar de características comuns, as células-tronco mesenquimais obtidas de diferentes tecidos podem ter diferentes pontencialidades e aplicações terapêuticas.

1.4 CÉLULAS PERIVASCULARES: PRECURSORES MULTIPOTENTES

Apesar das fontes já estabelecidas de células tronco mesenquimais (CTM) como medula óssea, tecido adiposo e sangue de cordão umbilical e placentário, a identidade e nicho tecidual das CTM era controverso. Recentemente as células perivasculares, ou pericitos são indicadas como as células tronco-mesenquimais com potencial de aplicação em terapias celulares.

As células perivasculares são células residentes teciduais também chamadas de células murais e células de Rouget e foram descritas há mais de 100

anos por Eberth e Rouget, conforme revisto (HIRSCHI E D'AMORE, 1996). Atuam na homeostasia dos vasos e resposta inflamatória (GERHARDT E BETSHOLTZ, 2003). Estas células podem ser classificadas em pericitos quando localizadas na membrana basal de pequenos vasos (EGGINTON, HUDLICKA *ET AL.*, 1996) ou células vasculares de músculo liso (CVML) em vasos de maior calibre. De uma forma geral ambas representam subtipos de populações celulares relacionadas (BRACHVOGEL, MOCH *et al.*, 2005) e é bastante comum que pericitos sejam referidos como CVML (BERGERS E SONG, 2005).

Em termos de aplicação em medicina, existem vários relatos do potencial de pericitos de se diferenciarem em várias linhagens mesenquimais (HIRSCHI E D'AMORE, 1996) como osteoblastos, condrócitos, adipócitos e células vasculares de músculo liso, o que seria uma via natural de diferenciação, fibroblastos durante reparo tecidual, macrófagos no sistema nervoso central e músculo esquelético (DIAZ-FLORES, GUTIERREZ *ET AL.*, 1992), (SUNDBERG, IVARSSON *ET AL.*, 1996), (THOMAS, 1999), (SIMS, 2000), (DELLAVALLE, SAMPAOLESI *ET AL.*, 2007). CVML e células perivasculares de cordão umbilical também foram descritas com potencial de diferenciação em vários tipos celulares mesenquimais (ROMANOV, SVINTSITSKAYA *et al.*, 2003), (SARUGASER, LICKORISH *et al.*, 2005).

A associação entre células perivasculares e CTM foi relatada por Shi & Gronthos em 2003 (SHI E GRONTHOS, 2003), que isolaram CTM de medula óssea e polpa dentária pela expressão do marcador STRO-1 e verificaram a co-expressão com marcadores de pericitos como CD146, alfa actina de músculo liso e o antígeno de superfície 3G5. Posteriormente, o potencial de diferenciação em várias linhagens mesenquimais foi observado em células perivasculares expressando anexina 5, um marcador de pericitos (BRACHVOGEL, MOCH *et al.*, 2005). Outros trabalhos também apontam a localização perivascular das CTM, como o isolamento e caracterização de CTM de praticamente todos os tecidos em modelo murino (DA SILVA MEIRELLES, CHAGASTELLES *et al.*, 2006), e a expressão de diversos marcadores de pericitos em CTM humanas isoladas de vários tecidos adultos e fetais, indicando também a origem perivascular das células tronco mesenquimais humanas (CRISAN, YAP *et al.*, 2008). Outros relatos incluem a expressão de CD146, um marcador de pericitos, em células tronco mesenquimais humanas de

diversos tecidos (COVAS, PANEPUCCI *et al.*, 2008), e a expressão de marcadores de pericitos em CTM provenientes de tecido adiposo humano (ZANNETTINO, PATON *ET AL.*, 2008). Recentemente foi proposta a teoria de nicho perivascular das CTM por da Silva Meirelles e colaboradores (DA SILVA MEIRELLES, CAPLAN *et al.*, 2008). Segundo sua hipótese, em situações fisiológicas, as células tronco do nicho perivascular estabilizariam os vasos e contribuiriam para a homeostasia tecidual e do sistema imune. Em situações de injúria, assumiriam papel mais ativo no reparo tecidual. Este modelo sugere uma integração entre as células tronco mesenquimais, o sistema imunológico e a homeostasia dos vasos sanguíneos.

Em termos de ontogenia, progenitores de pericitos foram descritos na aorta de ratos (HOWSON, APLIN *et al.*, 2005) e na medula óssea (LAMAGNA E BERGERS, 2006). No desenvolvimento embrionário, os dados sobre formação da microvasculatura são esparsos, muito embora existam evidências de que pericitos e células vasculares de músculo liso tenham a mesma origem em um mesmo tecido (ETCHEVERS, VINCENT *et al.*, 2001). Além disso, existiriam pelo menos 7 fontes possíveis de CVML/pericitos, o que responderia pela heterogeneidade desta população celular, inclusive na resposta específica de cada órgão ou tecido a agressões e/ou estímulos diversos (MAJESKY, 2007). Logo, isolar células perivasculares do órgão alvo de estudo pode constituir uma boa abordagem visando aplicação futura em medicina.

Desta forma, para aplicação em terapias celulares, é necessário isolar, caracterizar e estudar o potencial de diferenciação em cardiomiócitos de pericitos cardíacos humanos. É provável que fatores que regulem a ativação de pericitos em outros tecidos sejam o ponto de partida para a compreensão de sua ativação no tecido cardíaco.

Além disso, por se tratar de população celular tecidual, as células perivasculares podem representar progenitores cardíacos residentes, definindo assim o seu papel como reservatório de células progenitoras nos mais diversos tecidos, incluindo o coração.

1.5 TERAPIA CELULAR PARA DOENÇAS CARDIOVASCULARES E CÉLULAS-TRONCO RESIDENTES CARDÍACAS

Terapias celulares com uso de células-tronco de diversas origens são propostas como alternativa para o tratamento da insuficiência cardíaca (LI, JIA *et al.*, 1996, KESSLER e BYRNE, 1999, TOMITA, S., LI, R. *et al.*, 1999; TOMITA, S., LI, R. K. *et al.*, 1999, ORLIC, KAJSTURA *et al.*, 2001, WANG, SHUM-TIM *et al.*, 2000, KIM, LI *et al.*, 2001, SHAKE, GRUBER *et al.*, 2002 e STRAUER, BREHM *et al.*, 2005). Contudo, existem várias limitações para utilização de terapias celulares para o tratamento de doenças cardíacas apesar do grande número de tentativas de terapia experimental como a grande variabilidade no potencial de diferenciação em cardiomiócitos e na recuperação da efetiva atividade contrátil do coração (BOLLINI, SMART *et al.*, 2010).

O uso de células-tronco mesenquimais também foi avaliado. Contudo, algumas questões permaneceram em aberto como a baixa permanência de células transplantadas no miocárdio, problemas na integração eletromecânica de células implantadas, além dos resultados controversos da literatura (HENG, HAIDER *et al.*, 2004 e BALLARD e EDELBERG, 2008). Desta forma, as células progenitoras residentes cardíacas com potencial de diferenciação nas linhagens constitutivas do tecido cardíaco representam uma nova e promissora fonte de células para aplicação em terapias celulares.

Em 2001 foram lançadas as primeiras evidências de que ocorre proliferação de miócitos cardíacos humanos após infarto do miocárdio, principalmente nas regiões periféricas ao local de isquemia (BELTRAMI, URBANEK *et al.*, 2001). Este trabalho foi o primeiro a questionar o dogma de que o coração é um órgão pós-mitótico e indicou que a regeneração de miócitos cardíacos ocorre em resposta a injúrias como o infarto. Posteriormente progenitores cardíacos residentes foram identificados em murinos com base na expressão de marcadores de células-tronco e a população lin⁻/CD117 foi capaz de formar cardiomiócitos, músculo liso e endotélio *in vitro* e *in vivo* (BELTRAMI, BARLUCCHI *et al.*, 2003). Este trabalho ampliou as perspectivas de aplicação de terapia celular para regeneração de miocárdio e foi o primeiro a identificar progenitores cardíacos residentes. Em 2007

esta população celular foi identificada em humanos (BEARZI, ROTA *et al.*, 2007). Progenitores cardíacos também foram identificados pela expressão de sca-1 em murinos, MDR-1 e Isl-1 conforme revisto (BARILE, MESSINA *et al.*, 2007, FINE, LIAO *et al.*, 2008 e BALLARD E EDELBERG, 2008). Tecidos cardíacos normais e patológicos são sujeitos a diferentes estímulos, desta forma podem apresentar perfil diferente de células progenitoras residentes. Conforme indicado por Di Meglio (DI MEGLIO, NURZYNSKA *et al.*, 2007), cultivos celulares provenientes de tecidos normais apresentavam maior número de progenitores residentes cardíacos, indício de manutenção de células precursoras nos corações normais enquanto que nos cultivos de origem patológica foram observadas mais células diferenciadas indicando a ativação e remodelamento cardíaco em tecidos pós-isquêmicos.

1.6 FOSFATASE ALCALINA COMO MARCADOR DE CÉLULAS-TRONCO

Apesar dos grandes avanços na identificação dos progenitores cardíacos residentes e avaliação de suas características, sua origem tecidual não está completamente elucidada. É possível que esta população celular seja de origem medular posto que os marcadores utilizados também são expressos em células-tronco mesenquimais de medula óssea (POULY, BRUNEVAL *et al.*, 2008). Contudo populações de células multipotentes residentes teciduais, como as células perivasculares, são apontadas como células-tronco mesenquimais residentes (DA SILVA MEIRELLES, CAPLAN *et al.*, 2008 e CRISAN, YAP *et al.*, 2008) e está em aberto se as células-tronco mesenquimais cardíacas constituem progenitores cardíacos residentes com potencial de diferenciação em linhagens cardíacas.

O relato de que pericitos de tecido muscular esquelético purificadas com base na expressão do marcador de superfície fosfatase alcalina têm potencial de se diferenciar em músculo esquelético (DELLAVALLE, SAMPAOLESI *et al.*, 2007) é bastante promissor e abre perspectivas para o estudo do potencial de diferenciação de pericitos cardíacos em cardiomiócitos, muito embora até o momento não existam relatos desta via de diferenciação em humanos.

É cada vez mais provável o papel de pericitos cardíacos como população de células cardíacas residentes, conforme descrito recentemente para células de origem perivascular, os mensagioblastos, isolados de coração de murinos jovens. Esta população celular expressa marcadores de pericitos e apresenta potencial de diferenciação em cardiomiócitos *in vitro* e *in vivo* (Galvez, SAMPAOLESI *et al.*, 2008).

Em termos de marcadores de células-tronco, uma proteína descrita inicialmente como MSCA-1 (*mesenchymal stem cell antigen-1*) (BATTULA, TREML *et al.*, 2009), posteriormente foi indetificada como identica a enzima fosfatase alcalina tecido não específica (SOBIESIAK, SIVASUBRAMANIYAN *et al.*, 2009).

A enzima fosfatase alcalina é um proteína dimérica, que catalisa a hidrólise de fosfomonoesteres, resultado na liberação de fosfato inorgânico a partir de biomoléculas (MORNET, STURA *et al.*, 2001). Esta enzima está presente em todos os organismos e em vários tecidos humanos. 4 isoformas foram identificadas em humanos: intestinal, placentária, de células germinativas e fosfatase alcalina tecido não específica (MORNET, STURA *et al.*, 2001). Esta isoforma é uma glicoproteína de 57 kDa e 524 aminoácidos associada a membrana plasmática via ancora de glicosilfosfatidil inositol, desta forma pode ser utilizada como marcador celular para caracterização por imunofenótipo ou seleção de populações celulares. Esta proteína é um marcador bem conhecido de células-tronco embrionárias (O'CONNOR, KARDEL *et al.*, 2008 e ADEWUMI, AFLATOONIAN *et al.*, 2007) e também é um marcador de progenitores neuronais em camundongos (LANGER, IKEHARA *et al.*, 2007). A fosfatase alcalina também foi identificada como progenitores miogênicos em músculo esquelético humano, onde foi associada à pericitos (DELLAVALLE, SAMPAOLESI *et al.*, 2007 e DELLAVALLE, MAROLI *et al.*, 2011) e também foi descrita como marcador de células-tronco mesenquimais presentes em endométrio (SCHWAB E GARGETT, 2007).

Já é sabido que células-tronco mesenquimais podem ser isoladas de tecido cardíaco humano, contudo não está claro se células cardíacas humanas que expressem a fosfatase alcalina apresentam características de células-tronco mesenquimais.

2 JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo. Em razão disto, além do desenvolvimento de alternativas cirúrgicas ou novos fármacos, a terapia celular para o sistema cardiovascular é amplamente estudada, seja com a finalidade de regenerar o tecido cardíaco danificado, induzir a formação de novos vasos ou mesmo utilizar as células como secretoras de fatores parácrinos benéficos para a reversão ou estabilização do quadro clínico do paciente. Contudo, apesar dos resultados promissores com a utilização de células-tronco mesenquimais de medula óssea ou células mononucleares de medula óssea em modelos pré-clínicos ou em ensaios clínicos, o número de células que migram ou permanecem no tecido cardíaco após sua infusão por diferentes vias é baixo. A utilização de célula progenitora proveniente do tecido cardíaco pode favorecer a migração e integração desta célula em áreas lesionadas do coração, constituindo assim uma possível nova fonte de células com aplicação em terapia celular do sistema cardiovascular.

Espera-se com o desenvolvimento desta pesquisa isolar células progenitoras residentes cardíacas humanas baseadas na expressão do marcador fosfatase alcalina, presente em células perivasculares. Uma vez estabelecidos os cultivos de células progenitoras cardíacas que expressam fosfatase alcalina, essas células serão caracterizadas e avaliadas quanto ao potencial de diferenciação em células mesenquimais como adipócitos, condrócitos e osteoblastos, cardiomiócitos e células endoteliais, definindo primeiramente se estas células podem atuar como células-tronco mesenquimais, como já descrito para pericitos de outros tecidos. Desta forma o presente estudo é de grande relevância como pesquisa básica para a caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação das células tronco residentes cardíacas aplicadas a terapias celulares do sistema cardiovascular.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Isolamento, caracterização, ativação e diferenciação em linhagens mesenquimais de pericitos cardíacos humanos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar e cultivar células cardíacas humanas.
2. Purificar células positivas para a fosfatase alcalina.
3. Caracterizar celular e molecularmente o cultivo de células positivas para a fosfatase alcalinas através de citometria de fluxo, imunofluorescência, RT-PCR e/ou q-PCR e western blot.
4. Induzir diferenciação em linhagens mesenquimais.
5. Expor células positivas para a fosfatase alcalina a condições descritas como indutoras de diferenciação em cardiomiócitos e células endoteliais.
6. Analisar o fenótipo das células antes e depois de induzidas a células mesenquimais, cardiomiócitos e endotélio quanto à presença de marcadores específicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 FLUXOGRAMA

As etapas experimentais deste trabalho foram organizadas em forma de fluxograma (FIGURA 1) e incluem o isolamento celular, caracterização celular e molecular, purificação celular com base na expressão do marcador fosfatase alcalina e realização de ensaios de diferenciação celular em linhagens mesenquimais, cardiomiócitos e células endoteliais.

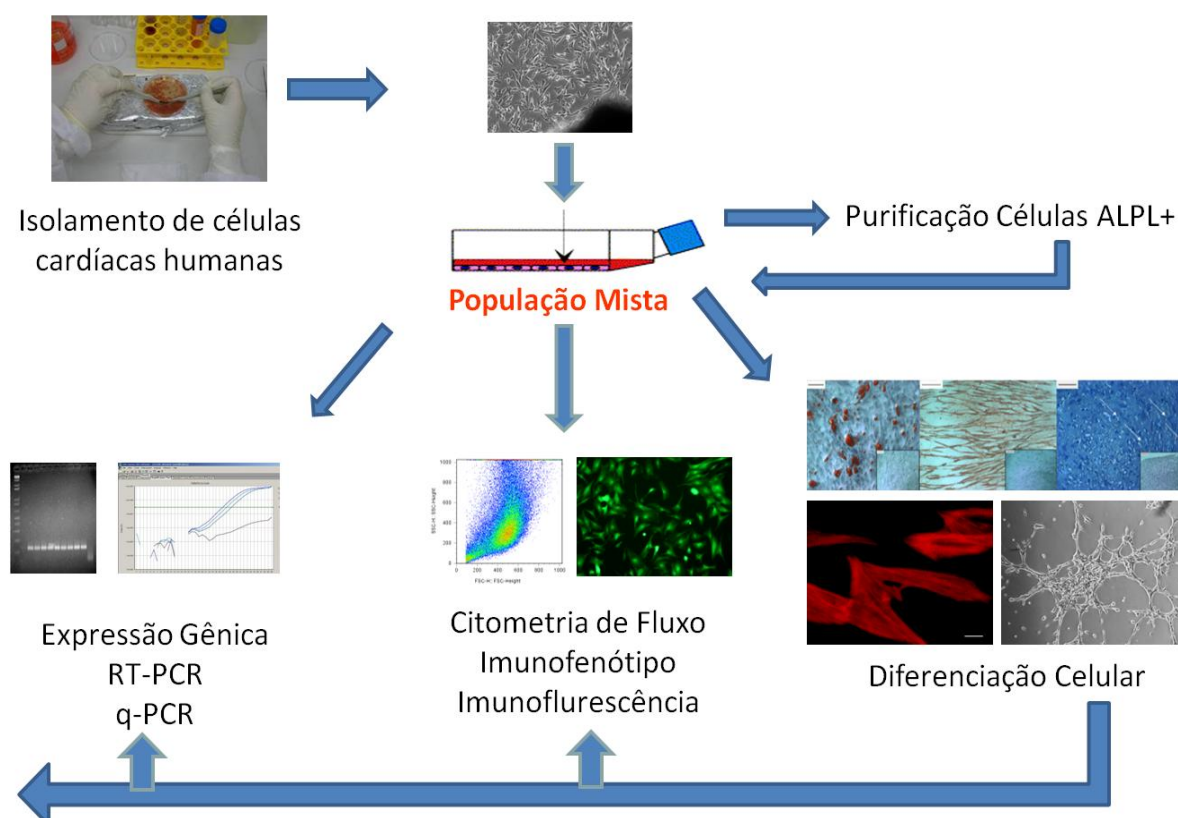


FIGURA 1: Esquema do isolamento de células cardíacas humanas pelo método de cultura de explantes.

Os fragmentos de tecido cardíaco humano foram dissociados mecanicamente com uso de bisturi (a), em seguida foram transferidos para frascos de cultura (b) e o meio de cultura foi adicionado (c). O frasco de cultura contendo os explantes cardíacos foi incubado invertido (d) por 30 a 60 min em estufa a 36,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ (e). O frasco de cultivo era virado para a posição de cultivo e seguiam-se trocas de meio de cultura parciais semanais (f).

Fonte: A autora (2011)

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Em relação às questões éticas sobre a utilização de miocárdio proveniente do material descartado durante a dissecação de valvas cardíacas humanas pelo Banco de Homoenxertos da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba (BHSC), entende-se que é possível utilizar este material proveniente de coração que foi doado segundo termo de doação de órgãos e tecidos do Estado, contudo não apresentava condições de utilização em transplante e foi destinado ao BHSC, considerando:

1 - A Legislação Brasileira permite a utilização de tecidos, órgãos ou parte do corpo humano para pesquisa científica desde que esgotadas as possibilidades de utilização em transplante de acordo com a Portaria GM nº 263 de 31 de março de 1999.

2 – Existe precedente de aprovação do projeto de pesquisa “Expansão e diferenciação *in vitro* de células progenitoras do ducto pancreático humano adulto em células produtoras de insulina” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da PUCPR (ofício 87/04/CEP-CCBS). Com base na utilização para fins de pesquisa de pâncreas humanos impróprios para utilização em transplante, conforme Portaria GM nº 263 de 31 de março de 1999 e termo de autorização de remoção de órgãos e tecidos.

3 – O responsável pelo BHSC autoriza a utilização deste material, de acordo com a legislação vigente com respeito à confiabilidade dos dados dos doadores.

Além disso, o presente projeto é uma das etapas do projeto de pesquisa “Caracterização Celular e Molecular do Potencial de Diferenciação de Células-Tronco Mesenquimais Adultas: Aplicação em Terapias Celulares do Sistema Cardiovascular”, aprovado em 10 de outubro de 2007 sob o número 419/07 no Comitê de Ética em Pesquisa – FIOCRUZ.

4.3 COLETA DO TECIDO CARDÍACO

Fragmentos de miocárdio humano foram obtidos da dissecação de válvulas cardíacas realizado pelo Banco de Homoenxertos da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba (BHSC). Foram utilizadas amostras de aurícula direita e ventrículo direito neste estudo. Os fragmentos de tecido foram recolhidos em meio de cultura nutriente F12 suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 100 UI/ml de penicilina, e 0,1 mg/ml streptomycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Estas amostras foram mantidas a 4°C por um período de até 48 h antes do processamento.

4.4 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS

4.4.1 Dissociação tecidual

Em condições assépticas, o tecido cardíaco humano foi lavado com solução salina balanceada (BSS) e sua massa determinada. Cerca de 500 a 900 mg de tecido era dissociado mecanicamente com uso de bisturi em explantes de cerca de 1 a 2 mm³ (FIGURA 1a). Os explantes eram utilizados para isolamento celular por cultura de explantes ou para dissociação enzimática, conforme metodologias descritas a seguir.

4.4.2 Cultura de explantes

Cerca de 100 mg de explantes cardíacos foram transferidos para cada frasco de cultivo com área de 25 cm² (TPP, Trasadingen, Switzerland) sob superfície recoberta com filme de colágeno tipo I (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) (FIGURA 2b). Para adesão dos explantes à superfície de cultura, o frasco de cultivo foi incubado com o lado onde foram plaqueados os explantes voltados para cima e o meio de cultura era adicionado do lado oposto, sem contato direto com os explantes (FIGURA 2c). Os frascos de cultivo eram incubados nesta condição por 30 a 60 min a temperatura de 36,5 a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em estufa úmida Modelo HEPA Class 100, series II (Thermo Scientific) (FIGURA 2 d – e). Após esse período de incubação, a garrafa de cultivo foi virada lentamente para que o meio de cultura cobrisse os explantes já aderidos (FIGURA 2f). Os explantes foram cultivados em meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell ® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF), 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 5 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b), 0,1 mM de β-mercaptoetanol, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 100 IU/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de streptomina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) conforme descrito por Dellavalle (DELLAVALLE, SAMPAOLESI *et al.*, 2007). Os cultivos foram mantidos por 15 a 30 dias a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO₂, com trocas periódicas de metade do meio de cultivo semanalmente. O procedimento de isolamento celular por cultivo de explante foi considerado bem sucedido se em até 30 dias fosse observada migração celular, quanto foi realizado o primeiro repique celular.

Após a migração celular a partir dos explantes de tecido cardíaco humano, as células foram repicadas e mantidas, conforme descrito no procedimento de repique celular. Os explantes eram removidos da suspensão celular com o uso de filtro tipo “cell strainer” com membrana de nylon com poros de 40 µm (BD Falcon™, San José, California, EUA).

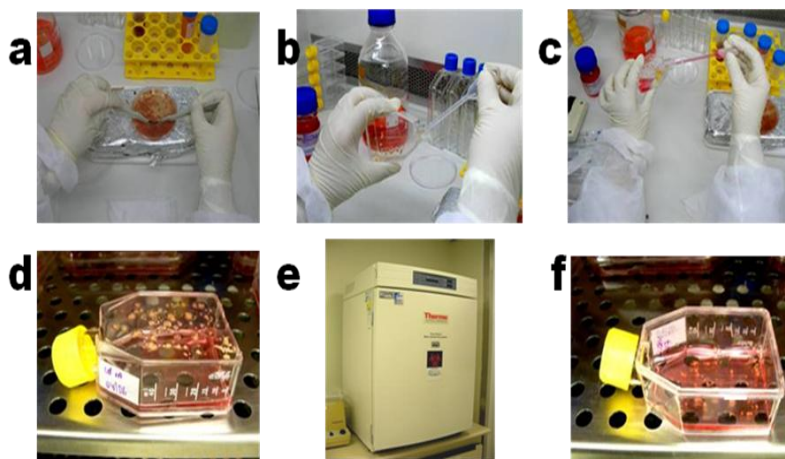


FIGURA 2 - Esquema do isolamento de células cardíacas humanas pelo método de cultura de explantes. Os fragmentos de tecido cardíaco humano foram dissociados mecanicamente com uso de bisturi (a), em seguida foram transferidos para frascos de cultura (b) e o meio de cultura foi adicionado (c). O frasco de cultura contendo os explantes cardíacos foi incubado invertido (d) por 30 a 60 min em estufa a 36,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ (e). O frasco de cultivo era virado para a posição de cultivo e seguiam-se trocas de meio de cultura parciais semanais (f).
FONTE: Fotos de Itamar Crispim (2008) a pedido da autora.

4.4.3 Dissociação Enzimática

Cerca de 500 a 1000 mg de explantes cardíacos foram lavados em solução salina balanceada (BSS) e submetidos ao procedimento de dissociação enzimática com combinações de enzimas conforme TABELA 1, com a finalidade de dissociar o tecido cardíaco e liberar células cardíacas humanas.

Combinação de Enzimas	Concentração de uso	Fabricante
Colagenase I	2 U/mL	Invitrogen
Colagenase II/Dispase	2 U/mL/0,6U/mL	Invitrogen
Liver Digest	Pronto para uso	Invitrogen

TABELA 1 - Enzimas utilizadas para dissociação enzimática
Fonte: A autora (2011)

A dissociação enzimática (FIGURA 3) foi realizada em frascos estéreis com homogeneizadores, por 1 a 3 ciclos de 30 a 60 minutos a temperatura de 37°C, até dissociação aparente do tecido cardíaco. Seguiu-se a homogeneização da suspensão celular obtida e os fragmentos dos explantes cardíacos eram removidos da suspensão celular com o uso de filtro tipo “cell strainer” com membrana de nylon com poros de 40 µm (BD FalconTM, San José, California, EUA). Foram realizadas 3 lavagens em solução salina balanceada a 1200 rpm por 10 minutos a 2 a 8°C. As células foram purificadas em gradientes de densidade de Histopaque 1077 (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) com centrifugação a 1500 rpm por 20 minutos a 20°C. As frações de anel sob o gradiente de densidade e pellet foram recolhidas e lavadas 3 vezes em solução salina balanceada a 1200 rpm por 10 minutos a 2 a 8°C. Eram realizadas análises da viabilidade celular e feito o plaqueamento de 4×10^4 células/cm² em frascos de cultivo sob superfície recoberta com filme de colágeno tipo I (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) em meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell ® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF), 2 mM de L-glutamina (GibcoTM Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 5 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b), 0,1 mM de β-mercaptoetanol, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 100 IU/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de streptomomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) conforme descrito por Dellavalle (DELLAVALLE, SAMPAOLESI *et al.*, 2007). Os cultivos foram mantidos por 15 a 30 dias a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO₂, com trocas periódicas de metade do meio de cultivo semanalmente.

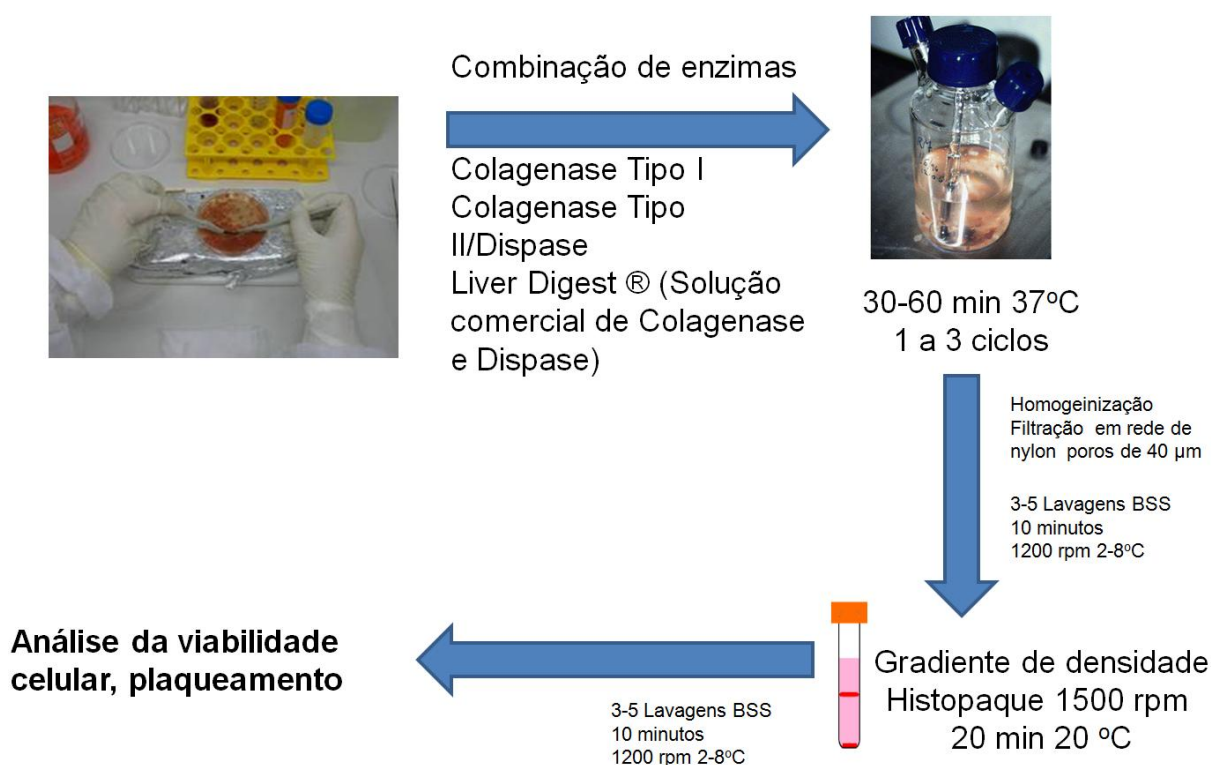


FIGURA 3 - Esquema do isolamento de células cardíacas humanas pelo método de dissociação enzimática. Os fragmentos de tecido cardíaco humano foram dissociados mecanicamente com uso de bisturi, em seguida foram lavados em solução salina balanceada e transferidos para frascos de dissociação enzimática, com diferentes combinações de enzimas por 1 a 3 ciclos de 30 a 60 minutos a 37°C. A suspensão celular obtida era filtrada em rede com poros de nylon de 40 µm e então submetida ao gradiente de densidade Histopaque e as células das frações do anel e do precipitado foram então analisadas quanto a viabilidade e plaqueadas em frascos de cultura e seguiam-se trocas parciais de meio de cultivo semanalmente.

FONTE: Fotos de Itamar Crispim (2008) a pedido da autora.

4.5 MANUTENÇÃO E REPIQUE CELULAR

Os cultivos celulares derivados de células cardíacas humanas foram mantidos em meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF), 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 5 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b), 0,1 mM de β-mercaptoetanol, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em garrafas ou placas de

cultivo celular recobertas com filme de colágeno conforme descrito por Dellavalle (DELLAVALLE, SAMPAOLESI *et al.*, 2007). Os cultivos eram mantidos a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO₂, com trocas periódicas do meio de cultivo.

O repique celular era realizado quando a monocamada celular atingia 80% da confluência. Em condições assépticas, seguia-se a retirada do meio de cultivo, lavagem da monocamada com solução salina balanceada sem cálcio e magnésio (BSS-CMF) para facilitar a individualização celular, a qual era realizada com o uso de solução de 0,025% de tripsina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) em 0,02% de EDTA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Após a individualização celular, era adicionado meio de cultivo contendo soro fetal bovino para inativar a ação da enzima tripsina e seguia-se homogenização da suspensão celular. Realizava-se a contagem e avaliação da viabilidade celular com o uso do corante azul de trypan 0,4% (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA). As células eram plaqueadas na densidade de $0,2 - 0,5 \times 10^4$ células/cm². Em todos os experimentos foram utilizadas células entre as passagens 2 e 8.

4.6 PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA A FOSFATASE ALCALINA

Foram utilizados 2 protocolos de purificação de células positivas para fosfatase alcalina tecido não específica (ALPL+): o protocolo utilizando micropérolas magnéticas e o protocolo utilizando citometria de fluxo com sistema de separação celular, “cell sorting”.

4.6.1 Purificação celular com uso de micropérolas magnéticas

Para a seleção das células positivas para fosfatase alcalina (ALPL+), utilizaram-se suspensões celulares obtidas a partir de repique de amostras de células cardíacas humanas derivadas de aurícula. Cerca de $0,5$ a 2×10^7 células eram utilizadas para o processo de purificação celular com o uso do kit baseado em micropérolas magnéticas anti-IgG de camundongo CellaSelect™ (Invitrogen Dynal AS, de Oslo, Noruega), o procedimento de purificação celular foi realizado em conformidade com as instruções do fabricante.

A suspensão celular era lavada com centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos a 2 a 8°C em centrífuga refrigerada modelo BR4i (Joan) em tampão 2 de purificação celular contendo PBS com 0,1% de BSA e 2 mM de EDTA, a temperatura de 2 a 8°C. Seguia-se o bloqueio com 10 a 40 µL de soro humano normal tipo AB (Lonza, Walkersville, EUA) diluído 1:10 em tampão 2 de purificação celular por 10 a 15 minutos, sob agitação entre 2 e 8°C. Após, uma alíquota de 2 a 5×10^5 células era reservada para ser utilizada como controle da marcação por citometria de fluxo. Seguia-se a marcação das células com 1 a 4 µg de anticorpo biotilado anti-ALPL, monoclonal, produzido em camundongo (R & D Systems, Inc, Minneapolis, MN, EUA) por 30 a 60 minutos, sob agitação a 2 a 8°C. Após, uma alíquota de 2 a 5×10^5 células era reservada para ser utilizada para quantificação da população celular positiva para fosfatase alcalina por citometria de fluxo. Seguia-se a lavagem com tampão 2 para retirar o anticorpo excedente com centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos sob refrigeração.

A suspensão celular marcada com o anticorpo anti-fosfatase alcalina era submetida ao processo de separação celular onde as células positivas para a fosfatase alcalina foram purificadas com o kit anti-IgG de camundongo CellaSelect™ (Invitrogen Dynal AS, de Oslo, Noruega), em conformidade com as instruções do fabricante.

Utilizou-se de 25 a 100 µL de micropérolas magnéticas em 1 mL de tampão 1 de purificação contendo PBS com 0,1% de BSA. As micropérolas magnéticas (1 mL) eram incubadas com a suspensão celular marcada com o anticorpo biotilado anti-ALPL por 20 a 45 minutos, sob agitação a 2 a 8°C. As células positivas eram separadas das negativas com o uso de coluna magnética. Após a marcação com as micropérolas magnéticas, a mistura era submetida ao campo magnético por 2 minutos sob o qual as micropérolas magnéticas eram atraídas. As células que não aderiam as micropérolas magnéticas eram consideradas frações negativas para a

fosfatase alcalina e recolhidas no sobrenadante. Eram realizados 3 procedimentos de lavagem com tampão 1 PBS 0,1M pH 7,2 com 0,1% de albumina de soro bovino (BSA) e campo magnético por 2 minutos.

Era realizada a etapa de liberação das células aderidas as micropérolas magnéticas com o uso da enzima DNase, uma vez que uma sequência de DNA faz a ligação entre a micropérola magnética e o anticorpo anti IgG, capaz de reconhecer o anticorpo primário anti ALPL. Em resumo, neste etapa seguia-se incubação por 15 minutos, sob agitação a temperatura ambiente com 0,2 a 1 mL meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell®, suplementado com 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 4 a 20 µL de tampão de liberação contendo DNase, preparado conforme orientação do fabricante. Após incubação, as micropérolas magnéticas eram homogeneizadas com o uso de pipeta tipo "pasteur" e seguia-se a separação magnética por 2 minutos sob o qual as micropérolas magnéticas eram atraídas. As células que não aderiam as micropérolas magnéticas após o processo de liberação, eram consideradas fração positiva e recolhidas no sobrenadante. Após, uma alíquota de 2 a 5 x 10⁵ células era reservada para ser utilizada como controle da marcação por citometria de fluxo. Eram realizados 3 procedimentos de lavagem com meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell® e separação magnética.

Seguia-se a quantificação celular das frações celulares negativas e positivas por contagem em câmara de Neubauer com uso do corante vital azul de tripan. As células eram postas em cultivo na densidade de 0,2 – 0,5 x 10⁴ células/cm² em meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF), 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 5 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b), 0,1 mM de β-mercaptoetanol, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de streptomycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) conforme descrito por Dellavalle (Dellavalle, Sampaoli *et al.*, 2007) a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO₂, com trocas semanais de metade do meio de cultura.

As células purificadas, tanto as frações correspondendo ao controle isotópico, total marcada, ALPL positiva e ALPL negativas eram marcadas com streptavidina conjugada a ficoeritrina (PE) por 30 min sob agitação, temperatura de 2 a 8°C, e o rendimento do procedimento de purificação celular era avaliado em

citometro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, EUA) e análise dos dados foi realizada pelo programa Flow Jo versão 7.5 (Flowjo, USA).

As células purificadas eram mantidas em cultura e caracterizadas por imunofenotipagem e ensaios de análise de expressão gênica. As células também foram avaliadas quanto a seu potencial de diferenciação.

4.6.2 Purificação celular com uso de citometria de fluxo

Para a seleção das células ALPL+, utilizaram-se suspensões celulares obtidas a partir de repique de amostras de células cardíacas humanas derivadas de aurícula. Cerca de 0,5 a 1×10^7 células eram utilizadas para o processo de purificação celular com o uso de citometro de fluxo FACS Aria II (Becton Dickinson, San Jose, EUA).

A suspensão celular era lavada com centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos sob refrigeração em centrífuga modelo BR4i (Joan) em solução salina balanceada sem adição de cálcio, magnésio e vermelho de fenol (BSS.CMF). Seguia-se o bloqueio com 10 a 40 μ L de soro humano normal tipo AB (Lonza, Walkersville, EUA) diluído 1:10 em BSS.CMF sem adição de vermelho de fenol por 10 min a 2 a 8°C. Após, duas alíquotas de 2 a 5×10^5 células eram reservadas: uma delas era marcada com controle isotópico conjugado a R-Ficoeritrina (PE) e a outra era marcada com anticorpo anti-CD105 PE ou anti-CD140b PE, para ser utilizado como controle positivo da marcação. Seguia-se a marcação das células com 10 μ L de anticorpo anti-ALPL monoclonal, produzido em camundongo conjugado a PE (R & D Systems, Inc, Minneapolis, MN, EUA), para cada 1×10^6 células. Seguia-se a marcação por 60 min a 2 a 8°C. Após, seguia-se a lavagem com solução de BSS.CMF sem adição de vermelho de fenol para retirar o anticorpo excedente com centrifugação a 2000 rpm por 5 min sob refrigeração. As células eram ressuspensas em meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com 1% de SFB, 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de streptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis,

MO, EUA) e 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA).

Em citometro de fluxo FACS Aria II era feita a seleção de populações celulares positivas e negativas para a fosfatase alcalina com base na expressão da fluorescência para o fluoróforo PE. Após citometria analítica para definição das regiões correspondentes as populações de interesse, era iniciado o procedimento de separação celular. Os parâmetros do equipamento utilizados eram: nozzle de separação celular de 85 micrometros, e a velocidade de fluido (tampão fosfato estéril) era regulada para manter a taxa de aquisição de eventos para a separação celular em torno de 500 a 2500 eventos por segundo. Utilizava-se modo de pureza para maximizar a pureza das populações selecionadas. O “sorting” era realizado em torno de 30 a 90 min, e a amostra a ser submetida ao processo de purificação era mantida a 4°C, sob agitação de 300 rpm, durante todo o processo.

As amostras selecionadas, eram recolhidas em tubos contendo meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com 1% de SFB, 100 IU/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de streptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), sob refrigeração de 2 a 8°C. Após finalização do processo de separação celular, a pureza obtida era avaliada por citometria de fluxo. As células selecionadas eram lavadas com centrifugação a 2000 rpm, por 5 minutos a 2 a 8°C. As células eram plaqueadas de $0,25 - 0,8 \times 10^4$ células/cm² em meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell ® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF), 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 5 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b), 0,1 mM de β-mercaptoetanol, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de streptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) conforme descrito por Dellavalle (Dellavalle, Sampaolesi *et al.*, 2007) em garrafas ou placas de cultivo celular recobertas com filme de colágeno tipo I (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Os cultivos eram mantidos a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO₂, com trocas periódicas do meio de cultivo.

4.7 CARACTERIZAÇÃO CELULAR

Os cultivos celulares obtidos foram caracterizados morfologicamente por visualização ao microscópio invertido e pela expressão de marcadores específicos de células-tronco mensequimais, células perivasculares, entre outros (DOMINICI, LE BLANC *et al.*, 2006; DELLAVALLE, SAMPAOLESI *et al.*, 2007) pelas técnicas de citometria de fluxo, imunofluorescência, RT-PCR e q-PCR padronizadas por nosso grupo (REBELATTO, AGUIAR *et al.*, 2008; REBELATTO, AGUIAR *et al.*, 2009). Iniciadores utilizados são listados no APÊNDICE A e anticorpos utilizados são listados no APÊNDICE B.

4.7.1 Análise da expressão de fosfatase alcalina pelas células cardíacas humanas

4.7.1.1 Preparo de extrato protéico de células cardíacas humanas

Os extratos protéicos das células cardíacas humanas foram preparados a partir de suspensão das células cardíacas humanas derivadas de aurícula. Após contagem celular, cerca de 1×10^6 células foram submetidas ao processo de lise na proporção de 1000 células/ μ l, com solução de lise 20 mM Hepes pH 7,4, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 1% Triton X-100, 10% glicerol, 1 mM dithiothreitol, 1 μ l *cocktail* de inibidores de protease, por 1 hora a 4°C. Logo em seguida, o lisado foi centrifugado a 12500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubo de 1,5 ml e foi acrescentado o tampão de desnaturação Tris-HCl 160 mM pH 6,8, SDS 4%, β -mercaptoetanol 10%, glicerol 24%, azul de bromofenol 0,02%, e seguiu-se incubação

a 94°C por 10 minutos. O extrato protéico era aliquoteado e estocado a -20°C até o momento do uso (SHIGUNOV, SOTELO-SILVEIRA *et al.*, 2011).

4.7.1.2 Eletroforese em gel de proteína (SDS-PAGE)

As proteínas foram desnaturadas com tampão de amostra como descrito anteriormente e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970).

Em resumo, foram aplicados em gel de poliacrilamida volumes de 1, 2,5 5 e 10 µL do extrato de células totais de aurícula humana. Para a determinação da concentração dos géis foi levado em consideração a massa molecular da enzima fosfatase alcalina de 57 KDa, e utilizou-se gel de poliacrilamida a 15%. A separação protéica era realizada a 30 mA de corrente elétrica durante 90 a 120 minutos. Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com solução de Coomassie Blue R-250 por 30 minutos sob agitação e o gel foi descorado com solução de descoloração (metanol 30 %, ácido acético 10 %) até a visualização das bandas, seguido de sucessivas lavagens com água destilada.

4.7.1.3 Ensaio de Western Blot

A técnica de Western blot consiste na transferência de proteínas, previamente separadas por SDS-PAGE, para um suporte sólido (membrana de nitrocelulose) (TOWBIN, STAEBELIN *et al.*, 1979). Após a eletroforese, os polipeptídeos foram eletro transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL) utilizando 60 V por duas horas a 4°C, em tampão de transferência 25

mM de Trisma base; 192 mM glicina e 20% (v/v) metanol. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau S (Ponceau S 0,5%, ácido acético 0,1%) para verificar a qualidade da transferência. Na sequência a membrana era descorada com PBS/Tween 0,1% e incubada em solução de bloqueio (5% de leite desnatado em PBS/Tween 0,1%) por 16 horas a 4°C. Após o bloqueio, a membrana era incubada com solução de bloqueio contendo o anticorpo primário anti-fosfatase alcalina (R&D Systems, EUA) na diluição de 1:100 por 2 horas a 37°C sob agitação e, em seguida, lavada três vezes por 5 minutos com solução de bloqueio. Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, (Promega, Madison, WI, EUA) diluído 1:7500 foi utilizado para revelação pelo método colorimétrico. Seguiu-se a incubação com as membranas por 1 hora em temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas com PBS/Tween 0,1% por três vezes durante 5 minutos. Para revelação pelo método colorimétrico, a membrana foi incubada em 10 ml de tampão para fosfatase alcalina com 66 µl de cloreto de nitroazul de tetrazólio (nitro blue tetrazolium, NBT) e 33 µl de mL p-toluidina 5-bromo-4-cloroindolilfosfato (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine, BCIP) (Promega, Madison, WI, EUA).

4.7.1.4 Avaliação da atividade *in situ* de fosfatase alcalina

Foi avaliada a atividade *in situ* da enzima fosfatase alcalina nas células cardíacas humanas. Os cultivos celulares foram realizados em lamínulas de vidro em placas de 24 poços, onde 0,2 a 0,5 x 10⁴ células por cm² foram plaqueadas. Para a realização do ensaio da atividade *in situ* de fosfatase alcalina, o meio era retirado e a lamínula era lavada 1 vez com PBS 0,1M pH 7,2. Adicionava-se 300 µl de solução fixadora 4% paraformaldeído (PFA) em PBS por 4 minutos a temperatura ambiente. A solução fixadora era removida com lavagem com PBS 3 vezes. Seguiu-se a incubação de cada lamínula com 300 µL de tampão para fosfatase alcalina com 5 ou 10 mM de MgCl₂, 2 µl de NBT (cromógeno) e 1 µl de BCIP (substrato). Foi avaliado o curso temporal da atividade da fosfatase alcalina por até 60 minutos em contato com o substrato. A reação era parada com a retirada da solução de

coloração e lavagem com PBS 3 vezes. Seguiu-se a coloração do núcleo celular com o uso 1 µg/µL de 4,6-diamidino-2 fenilindol (*4-6- diamidine-2-phenyl indole*, DAPI) em PBS por 10 minutos. Seguiu-se lavagem com PBS. Em uma lâmina gotejou-se 5µl de solução de n-propil galato a 200 µg/ml e adicionou-se a lamínula com a face contendo as células para baixo. Fixou-se a lamínula com uso de esmalte. Seguiu-se a visualização em microscópio com sistema de fluorescência Nikon Eclipse TE300 (Nikon, Tokyo, Japão) acoplado a uma câmera CoolSNAP™Pro_{cf} (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA). A visualização e captura das imagens foi realizada com o programa Image-Pro® PLUS v.4.5.1.29 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA). Edição e análise de imagens foi feita com o programa Image J v1.45 d (National Institute of Health, EUA).

4.7.2 Análise da expressão gênica

4.7.2.1 Extração de RNA

O RNA total dos cultivos celulares controle ou induzidos à diferenciação foi extraído utilizando o kit de isolamento RNeasy (Qiagen Inc, Austin, TX, EUA) conforme instruções do fabricante e tratado na coluna com DNase I (Qiagen Inc, Austin, TX, EUA). Em resumo, o meio de cultivo era retirado e a monocamada era lavada 1 vez com PBS 1M pH 7,4, estéril, a 37°C em volume suficiente para cobrir a monocamada celular.

Em capela química de exaustão, foi adicionado a cada amostra 600µL de tampão RPE (incluso no kit de extração de RNA) com 0,143 M de betamercaptoetanol (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) e homogeneizou-se até desagregação da monocamada celular. Recolheu-se o lisado para um eppendorf de 1,5 mL. Foi homogeneizado em vórtex por cerca de 1 minuto. Adicionou-se 600 µL de etanol 70% preparado em água DEPC e seguiu-se homogeneização. O lisado foi aplicado sob as colunas, aplicando até 700 µL da amostra sobre a coluna.

Centrifugou-se por 15 segundos a no mínimo 8000 x g e descartou-se o filtrado. Aplicou-se o restante do material (até no máximo 700 µL). Centrifugou-se por 15 segundos a no mínimo 8000 x g. Descartou-se o filtrado. Aplicou-se 350 µL de tampão RW1 (incluso no kit de extração de RNA) sobre a coluna e centrifugou-se por 15 segundos a no mínimo 8000 x g. Descartou-se o filtrado. Foi aplicado 80 µL de DNase I sobre a coluna e incubou por 15 minutos a 20-30°C. Aplicou-se 350 µL de tampão RW1 (incluso no kit de extração de RNA) sobre a coluna e centrifugou-se por 15 segundos a no mínimo 8000 x g. Descartou-se o filtrado com o tubo. Aplicou-se 500 µL de tampão RPE (incluso no kit de extração de RNA) sobre a coluna e centrifugou-se por 15 segundos a no mínimo 8000 x g. Descartou-se o filtrado e aplicou-se 500 µL de tampão RPE sobre a coluna. Centrifugou-se por 2 minutos a no mínimo 8000 x g. Descartou-se o filtrado com o tubo. A saída da membrana foi seca com auxílio de lenço de papel. Aguardou-se alguns minutos e aplicou-se 50 µL de água ultrapura livre de RNase (incluso no kit de extração de RNA). Aguardou-se alguns minutos e seguiu-se a centrifugação por 1 minuto a 10000 x g. O RNA foi dosado em espectrofotômetro Nanodrop modelo ND-100 (UNISCIENCE) e congelado em seguida a -70°C ou utilizado para a síntese de c-DNA.

4.7.2.2 Síntese de c-DNA

Para a síntese de c-DNA, foi utilizado o kit de transcrição reversa IMPROM II (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com instruções do fabricante com 1 µg de RNA total e 1 µL de 10 µM de iniciadores de oligo dT (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA).

Em resumo, se necessário procedeu-se a concentração das amostras de RNA em membrana microcon YM-30 (Millipore) para obter 1 µg de RNA em 8,6 µL. Ao RNA adicionou-se 1 µL de Oligo dT 10 µM e água ultra pura RNase free em quantidade suficiente para 10,4 µL. Incubou por 10 minutos a 70°C em equipamento termomixer modelo Confort (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Em seguida, adicionaram-se os outros componentes do kit de transcrição reversa: 4 µL do tampão

de reação ImProm II, 2,4 µl de MgCl₂ (25mM), 1 µl de dNTPs (10mM), 2 µl de Transcriptase Reverse (Promega, Madison, WI, EUA) além de 1 µl RNase Out (Promega, Madison, WI, EUA). Seguiu-se incubação por 2 horas a 42°C em equipamento termomixer. Procedeu-se a digestão do RNA com a adição de 0,5 a 2 µl de RNase H 2 U/µl (Promega, Madison, WI, EUA) e incubou-se por 30 min a 37°C. Para purificação do c-DNA adicionou-se 400 µl de H₂O ultra-pura e transferiu-se a solução para membrana de microcon YM-30 (Millipore) e centrifugou-se a 14.500 rpm por 9 minutos. Reconstituiu-se o volume para 500 µl com H₂O ultra-pura, foram feitas alíquotas de 20 µL e o c-DNA foi estocado a -20°C até o momento do uso.

4.7.2.3 Iniciadores

Para as reações de amplificação de ácidos nucleicos tanto em reações de RT-PCR ou q-PCR, foram utilizados iniciadores descritos em literatura ou desenhados em nosso laboratório com o uso da plataforma DNASTar (Laser Gene, Madison, WI, EUA), com base nas sequências dos genes humanos disponíveis no endereço eletrônico do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) conforme Apêndice A. Os iniciadores foram produzidos pela companhia *The Midland Certified Reagent* (Midland, Texas, EUA) com as seguintes características gerais: cada iniciador localizado em um exon diferente com um ou mais íntrons entre eles, a fim de não possibilitar a amplificação de DNA genômico ou de amplificar fragmento com tamanho bem diferente do esperado, o que indicaria contaminação da amostra com DNA genômico, temperatura de anelamento entre 55 e 62°C, baixa taxa de formação de gramplos.

4.7.2.4 RT-PCR

As reações de RT-PCR foram realizadas com 10 a 20 ng de c-DNA como molde, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,0625 mL de dNTPs e 1U de Taq Polimerase (Invitrogen™, NY, EUA), 5 a 10 pmol de cada iniciador, e água ultra-pura em volume adequado para completar 20 μ L de volume total de reação. Os parâmetros da reação de amplificação foram: 94°C por 3 minutos 1 vez seguido de 30 a 35 repetições de 94°C por 15 segundos, 50-62°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos, e incubação final a 72°C por 3 minutos realizado em equipamento termomixer modelo Confort (Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

O tamanho dos fragmentos amplificados de ácidos nucleicos foi verificado por eletroforese horizontal de ácidos nucléicos. Em resumo, os produtos da reação de PCR foram diluídos em tampão de amostra (Glicerol 10x, bromofenol blue 25% e xleno cianol FF 25%) na proporção de 4:1 e aplicados 25 μ L por poço em gel 2,0% de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), foram utilizados 2,5 μ L de padrão de tamanho de pares de bases 1 kb plus (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) previamente diluído em tampão de amostra, seguiu-se eletroforese horizontal em tampão TBE com voltagem de 50 a 80 mA por cerca de 45 minutos a 1 h e 30 minutos. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução contendo 0,2 mg/mL de brometo de etídeo em água por 20 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se lavagem em água destilada por 5 a 10 minutos. Para visualização dos ácidos nucléicos corados com brometo de etídeo, foi utilizado um UV Transiluminator Model M-26 (Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge, Reino Unido) e as imagens digitalizadas utilizando um *Electrophoresis Documentation and Analysis System 120* e o software Kodak 1D v.2.0.3 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA).

4.7.2.5 q-PCR

Para a realização do q-PCR foi inicialmente preparado solução contendo 10 μ L de Máster Mix de PCR com Sybr Green (Applied Biosystems, Warrington, Reino

Unido), 5 a 10 pmol de cada iniciador com polaridade positiva e com polaridade negativa e água ultra pura suficiente para um volume final de 15 µL. Esta mistura foi homogeneizada e distribuída na placa de PCR (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Foi feita curva padrão de amostras com diluições de uma amostra positiva para o gene em análise com fator de diluição 1:5 entre as diluições. As amostras da curva padrão e as amostras experimentais foram homogeneizadas e aplicadas na placa já contendo o mix no volume de 5µL por poço, em triplicata. A placa foi vedada com filme selante (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) e centrifugada por 1 minuto a 1500 rpm. A placa foi transferida para termociclador *Sequence Analyzer ABPRISM 7500* (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Os parâmetros da reação de amplificação foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 45 ciclos de (95°C por 15 segundos; 55 a 62°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos) seguido de extensão a 72°C por 3 minutos. Foi realizada curva de dissociação após a corrida para verificar a especificidade da reação de amplificação e consistiu do aumento da temperatura de 60 °C a 95 °C numa taxa de aproximadamente 1°C/40 segundos, com leitura contínua da fluorescência. Os dados de cada amplificação foram analisados em programa microsoft Office Excel, onde a média dos valores relativos de expressão dos genes alvo foi dividida pela média dos valores relativos da expressão de um gene que se expressa constitutivamente entre as amostras, no caso GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) ou RNA polimerase IIa. Desta forma, as amostras diferentes foram normalizadas de acordo com a expressão do gene constitutivo (gene normalizador).

4.7.3 Caracterização celular por imunomarcção

A população celular obtida a partir de tecido cardíaco humano foi avaliada quanto a expressão de marcadores como: CD105 (SH2), CD90 e CD73 (progenitores mesenquimais), CD117 (marcador de célula progenitora adulta), CD140b (receptor do PDGF-b), fosfatase alcalina, troponina I, troponina T, GATA4, NKX2.5, GATA6, MEF2C (marcadores de cardiomiocitos), entre outros marcadores descritos no APÊNDICE B. A aquisição dos dados de citometria de fluxo foi

realizada nos citômetros de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, EUA) ou FACSARIA II (Becton Dickinson, San Jose, EUA) e a análise dos dados foi realizada com uso do programa Flow Jo versão 7.5 (Flowjo, USA). Além disso, a expressão de alguns marcadores foram avaliados por imunofluorescência.

4.7.3.1 Imunofenotipagem de antígenos de superfície

As células (2 a 5×10^5) eram lavadas com PBS $0,1M$ pH $7,4$ por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. Seguia-se o bloqueio com $10 \mu L$ de soro humano normal tipo AB (Lonza, Walkersville, EUA) diluído $1:10$ em PBS por 10 minutos a 2 a $8^\circ C$. Adicionava-se 50 microlitros dos marcadores conjugados aos fluorocromos previamente ou de controles isotópicos e seguia-se incubação por 60 minutos ao abrigo da luz, a 2 a $8^\circ C$. Procediam-se 2 lavagens com PBS, por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. As células eram fixadas com $300 \mu L$ de solução de paraformaldeído 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 10 minutos. Seguia-se uma lavagem com PBS por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. Em seguida as células eram ressuspensas em $300 \mu L$ de PBS pH $7,4$ e mantidas a 2 a $8^\circ C$ até o momento da leitura em citômetro de fluxo.

4.7.3.2 Imunofenotipagem para antígenos intracelulares

As células (2 a 5×10^5) eram lavadas com PBS $0,1M$ pH $7,4$ por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. Seguia-se a incubação das células por 10 a 15 minutos a $20^\circ C$ com a solução de fixação e permeabilização (proporção de $1:10:9$ de solução de fixação e permeabilização FACS Lysing (Becton Dickinson, San Jose,

EUA), paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e água ultra pura, respectivamente) no escuro. Foram utilizados 500 µl dessa solução para cada 100.000 células. Após a incubação, as células eram lavadas com PBS e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. As células eram então ressuspensas em PBS e distribuídas em tubos de 1,5 ml de acordo com o número de amostras do experimento (aproximadamente 2 a 5×10^5 células por tubo). Seguia-se bloqueio com 100µl da solução de bloqueio (1µl de soro humano normal tipo AB (Lonza, Walkersville, EUA) em 99 µl de PBS) por 15 minutos a 2 a 8°C. Adicionava-se 10 µl de anticorpo primário e incubava-se a 37°C por 30 minutos. Lavava-se as células duas vezes com PBS e incubava-se a 37°C por 30 minutos com 10 µl de anticorpo secundário anti-igG com fluoróforo acoplado. Seguia-se lavagem por duas vezes com PBS e as células eram ressuspensas em 250 a 400 µl de PBS e mantidas a 2 a 8°C até a leitura no citometro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, EUA) ou FACSARIA II (Becton Dickinson, San Jose, EUA) de acordo com os fluoróforos conjugados aos anticorpos.

4.7.3.3 Imunofluorescência

A imunofluorescência foi realizada para localização celular e identificação da expressão de proteínas específicas após procedimento de indução da diferenciação celular conforme APÊNDICE B.

Os cultivos celulares foram realizados em lamínulas de vidro em placas de 24 poços, onde 0,2 a $0,5 \times 10^4$ células por cm^2 foram plaqueadas. Para a realização do ensaio de imunofluorescência, o meio era retirado e a lamínula era lavada 3 vezes com PBS 0,1M pH 7,4. Adicionava-se então a solução fixadora (+/- 300 µl) 4% paraformaldeído (PFA) em PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Foi feita a permeabilização com 0,5% de triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em PBS e incubação por 30 min a temperatura ambiente. Seguiu-se o bloqueio com BSA 5% em PBS por 60 min a temperatura ambiente. Foi adicionado o anticorpo

primário na diluição recomendada para cada anticorpo (APÊNDICE B) em 1% BSA em PBS. Foi utilizado 50 µL do anticorpo primário por lamínula e colocou-se parafilm sobre a lamínula. Incubou-se por 60 minutos a 37°C. Após incubação com o anticorpo primário, foram feitas 3 lavagens com PBS por 5 minutos sob agitação e seguiu-se a marcação com anticorpo secundário na diluição recomendada para cada anticorpo. Adicionou-se a diluição do anticorpo secundário (anti-anticorpo coelho, camundongo, cabra ou carneiro, de acordo com o alvo), conjugado com diferentes fluoróforos (APÊNDICE B). Foi utilizado 50 µL do anticorpo secundário por lamínula e colocou-se parafilm sobre a lamínula. Incubou-se por 60 minutos a 37°C. Após incubação com o anticorpo secundário, foram feitas 3 lavagens com PBS por 5 minutos sob agitação e seguiu-se a marcação com 1 µg/µL de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (*4'-6- diamidine-2-phenyl indole*, DAPI) em PBS por 10 minutos. Seguiram-se 3 lavagens com PBS por 5 minutos sob agitação. Em uma lâmina gotejou-se 5µl de solução de n-propil galato a 200 µg/ml e adicionou-se a lamínula com a face contendo as células para baixo. Fixou-se a lamínula com uso de esmalte. Seguiu-se a visualização em microscópio com sistema de fluorescência Nikon Eclipse TE600 (Nikon, Tokyo, Japão) acoplado a uma câmera CoolSNAP™Pro_{cf} (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA). A visualização e captura das imagens foi realizada com o programa Image-Pro® PLUS v.4.5.1.29 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA). Edição e análise de imagens foi feita com o programa Image J v1.45 d (National Institute of Health, EUA).

4.8 POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS EM LINHAGENS MENSEQUIMAIS

Com fins de avaliar se as células cardíacas isoladas apresentavam características semelhantes a células-tronco mesenquimais, estas foram cultivadas em meios indutores da diferenciação celular em adipócitos, osteoblastos e condrócitos conforme previamente realizado por nosso grupo (REBELATTO *et al.*, 2008). Utilizou-se como meio de cultura Dulbecco's Mega Cell ® (Sigma Chemical

CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com suplementos para indução da diferenciação celular em adipócitos, osteoblastos e condrócitos (Lonza, Cambrex BioScience, MD, EUA).

4.8.1 Diferenciação adipogênica

Células totais derivadas de aurícula (TAD) ou células positivas para fosfatase alcalina (ALPL+) foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro (Citotec, São Paulo, Brasil) em placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) para citotóxica ou diretamente em placas de 6 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) para análise da expressão gênica, em meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 5 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b), 0,1 mM de β -mercaptoetanol, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de streptomycina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) conforme descrito por Dellavalle (Dellavalle, Sampaoli *et al.*, 2007) a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO₂. Ao atingirem a semiconfluência (80%), trocou-se o meio de cultura para o meio de indução, composto por meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) adicionado de *hMSC Adipogenic SingleQuots* (Cambrex Bio Science, MD, EUA), que consistia de alíquotas de suplementos otimizados para indução da diferenciação adipogênica de CTM (SFB, L-glutamina, penicilina, streptomycina, insulina, indometacina, dexametasona e IBMX). A diferenciação adipogênica foi induzida em trocas cíclicas de meio: o meio de manutenção contendo os indutores de adipogênese eram trocados a cada 3 a 4 dias. Como controle, as células foram cultivadas em meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 5 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b), 0,1 mM de

β -mercaptoetanol, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 100 IU/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de streptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) conforme descrito por Dellavalle (DELLAVALLE, SAMPAOLESI *et al.*, 2007). Os cultivos foram mantidos por 21 dias a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO₂.

A coloração de Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi utilizado para a visualização de vacúolos ricos em lipídeos. As células foram fixadas com fixativo de Bouin (Biotec, Labmaster, Paraná, Brasil) por 10 minutos a temperatura ambiente, lavadas 2 vezes com etanol 70% e uma vez com água MilliQ® e corada com solução de 0,5% de Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 1 hora. Solução de Hematoxilina e Eosina (HE) (Biotec, Labmaster, Paraná, Brasil) foi utilizada para coloração nuclear. Para avaliar a diferenciação celular, 10 campos de três amostras biológicas independentes foram fotografados e realizou-se a quantificação da colocação das vesículas de lipídeos com o uso do programa Image J v1.45 d (National Institute of Health, EUA).

Também foi realizado q-PCR para estimar o nível de expressão do RNAm do gene marcador de adipócitos FABP4 ("fatty acid binding protein 4", de adipócitos) em amostras tratadas com meio de indução ou meio controle.

4.8.2 Diferenciação osteogênica

Células totais derivadas de aurícula (TAD) ou células positivas para fosfatase alcalina (ALPL+) foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro (Citotec, São Paulo, Brasil) em placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) para citotóxica ou diretamente em placas de 6 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) para análise da expressão gênica, em meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF), 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 5 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b), 0,1 mM de β -mercaptoetanol, 1% de

solução de aminoácidos não essenciais, 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de streptomycina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) conforme descrito por Dellavalle (DELLAVALLE, SAMPAOLESI *et al.*, 2007) a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO₂. Ao atingirem a semiconfluência (80%), trocou-se o meio de cultura para o meio de indução, composto por meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) adicionado de *hMSC Osteogenic SingleQuots* (Cambrex Bio Science, MD, EUA), que consistia de alíquotas de suplementos otimizados para indução da diferenciação osteogênica de CTM (SFB, L-glutamina, penicilina, streptomycina, ascorbato, dexametasona e β-glicerofosfato). A diferenciação osteogênica foi induzida em trocas cíclicas de meio: o meio de manutenção contendo os indutores de osteogênese eram trocados a cada 3 a 4 dias. Como controle, as células foram cultivadas em meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF), 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 5 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b), 0,1 mM de β-mercaptoetanol, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de streptomycina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) conforme descrito por Dellavalle (DELLAVALLE, SAMPAOLESI *et al.*, 2007). Os cultivos foram mantidos por 21 dias a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO₂.

A coloração de Von Kossa (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi utilizado para a visualização de acúmulo de cálcio. As células foram fixadas com fixativo de Bouin (Biotec, Labmaster, Paraná, Brasil) por 10 minutos a temperatura ambiente, lavadas 2 vezes com etanol 70% e uma vez com água MilliQ® e corada com solução de nitrato de prata 1% por 1 hora. Solução de Nuclear Fast red 0,1% (Biotec, Labmaster, Paraná, Brasil) foi utilizada para coloração nuclear por 5 minutos.

Também foi realizado q-PCR para estimar o nível de expressão do RNAm do gene marcador de osteoblastos como Col1 (colágeno tipo 1) em amostras tratadas com meio de indução ou meio controle.

4.8.3 Diferenciação condrogênica

Células foram mantidas em cultura de micromassa para promover a diferenciação condrogênica, que foram estabelecidas a partir de 2×10^5 células em 0,5 mL de meio. As células foram centrifugadas a 300 g por 10 minutos em tubos de polipropileno de 15 mL para formar pellet. Sem homogeneizar o pellet, as células foram mantidas em meio de indução, composto por meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) adicionado de *hMSC Chondrogenic SingleQuots* (Cambrex Bio Science, MD, EUA), que consistia de alíquotas de suplementos otimizados para indução da diferenciação condrogênica de CTM (L-glutamina, penicilina, streptomicina, ascorbato, dexametasona e β -glicerofosfato, piruvato de sódio, insulina-transferrina-selenito (ITS)). A diferenciação condrogênica foi induzida em trocas cíclicas de meio: o meio de manutenção contendo os indutores de osteogênese eram trocados a cada 3 a 4 dias. Como controle, as células foram cultivadas em meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF), 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 5 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b), 0,1 mM de β -mercaptoetanol, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de streptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) conforme descrito por Dellavalle (DELLAVALLE et al, 2007). Os cultivos foram mantidos por 21 dias a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO₂.

Os agregados celulares foram fixados com 10% de formaldeído (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente, desidratado em diluições seriadas de etanol e embebidos em blocos de parafina. Os cortes de parafina (4 μ m de espessura), foram corados com solução de azul de toluidina (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) para demonstrar a matriz extracelular de mucopolissacarídeos.

Também foi realizado q-PCR para estimar o nível de expressão do RNAm do gene marcador de condrócitos como col II (colágeno tipo II) em amostras tratadas com meio de indução ou meio controle.

4.9 POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS EM CARDIOMIÓCITOS

Com fins de avaliar se as células cardíacas humanas podem contribuir para a formação de músculo cardíaco e avaliar sua possível aplicação em terapia celular, foi utilizado o protocolo descrito por Smits e colaboradores (SMITS, VAN VLIET *et al.*, 2009) que utilizou células tronco extraídas de coração que expressam o marcador SCA1 e um protocolo de indução com o uso de 5 azacitidina, TGF-b1 e vitamina C.

Foi utilizado também o protocolo descrito por Galves e colaboradores (GÁLVEZ, COVARELLO *et al.*, 2009), com o uso de 5 azacitidina, soro fetal bovino e soro de cavalo.

4.9.1 Indução por 5 Azacitidina, TGF-b1 e vitamina C

Em resumo, as células ($1 \text{ a } 2 \times 10^4$ células/cm²) foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro recobertas com filme de colágeno em placas de 24 poços e incubadas a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas em meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell ® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF), 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 5 ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b), 0,1 mM de β-mercaptoetanol, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de streptomicona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Adicionou-se 5 µM de 5 Azacitidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) diariamente durante 3 dias consecutivos. Ao meio de cultivo, adicionava-se 0,1ng/mL de TGF-b1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a

cada 2 a 3 dias e adicionava-se 100mM de ácido ascórbico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em dias alternados até 21 dias.

4.9.2 Diferenciação celular induzida por 5-azacitidina

As células foram plaqueadas 1 a 2×10^4 células/cm² sobre lamínulas de vidro recobertas com filme de colágeno em placas de 24 poços e incubadas a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO₂ em meio de diferenciação composto de meio de cultivo Dulbecco's Mega Cell ® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF), 2% de soro de cavalo (Sigma) 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de streptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Após 24 horas, adicionou-se 5 µM de 5-azacitidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e as células foram incubadas a 36,5°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 5 dias, quando as amostras foram fixadas para avaliação dos marcadores de diferenciação celular.

4.10 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE TÚBULOS CAPILARES *IN VITRO*

O ensaio de formação de dutos ou túbulos capilares avalia se existem células endoteliais na população celular avaliada quando é observada a formação e manutenção dos dutos formados sob matrigel (SENEGAGLIA et al, 2010).

O Matrigel™ (Becton Dickinson, San Jose, EUA) foi descongelado em 4°C por 24 horas. Foram adicionados 250 µL de Matrigel™ em cada poço 30 minutos antes

do plaqueamento para polimerizar. As células foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 células em placas de 24 poços recobertas Matrigel™ e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para verificar a formação de túbulos capilares foram realizadas observações nos tempos de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 e 48 horas em microscópio invertido (Olympus CK40). As imagens foram obtidas por meio do sistema de captura de imagens *spot insight* (Diagnostic®).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados de idade do doador e tempo de isquemia foram expressos em termos de média \pm desvio padrão. Demais dados foram expressos em termos de média \pm erro padrão de 3 ou mais amostras biológicas independentes. Foi utilizado o teste exato de Fisher para comparar a taxa de sucesso para isolamento celular entre amostras de aurícula e ventrículo. Teste t de Student foi utilizado para as demais comparações entre amostras. $p < 0.05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DO ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS

Na primeira etapa do projeto, foram feitos ensaios piloto para avaliar duas metodologias de isolamento de células cardíacas humanas: dissociação enzimática e cultura de explante. Foram utilizadas 7 amostras provenientes de ventrículo direito.

Foram feitos 2 ensaios com a enzima Colagenase 1A, 2 ensaios com a combinação das enzimas Colagenase 2/Dispase e 3 ensaios com a solução de Liver Digest. Para a dissociação enzimática ainda avaliaram-se as populações obtidas após gradiente de Histopaque, com a finalidade de melhorar o processo de purificação celular. Após 4 semanas do isolamento celular, foi avaliada a taxa de sucesso. Os resultados estão sumarizados na TABELA 2.

TABELA 2 - Comparativo do isolamento celular entre dissociação enzimática e cultura de explante.

Doador	Explante	Dissociação Enzimática		
		Colagenase 1	Colagenase 2/ Dispase	Liver Digest
1	SIM	SIM		
2	SIM	SIM		NÃO
3	NÃO			NÃO
4	SIM			NÃO
5	SIM	ND	ND	ND
6	SIM		NÃO	
7	SIM		SIM	

SIM: Sucesso no isolamento celular. Não: Insucesso no isolamento celular. ND: não determinado.

FONTE: a autora (2011).

O procedimento de dissociação enzimática obteve 100% de sucesso no isolamento celular com o uso da enzima colagenase 1A para os 2 primeiros ensaios realizados. Entretanto, durante o processo foram observados muitos debris provenientes do tecido de origem no meio de cultivo, apesar de que as etapas de lavagens e o gradiente de densidade supostamente deveriam reduzir a presença de debris no cultivo (FIGURA 4). Foram tentadas outras combinações de enzimas como Colagenase 2/Dispase, mas os debris não foram reduzidos e a taxa de sucesso no isolamento observada foi menor para colagenase 2/dispase 50% e sem sucesso com o uso da solução de enzimas comercial Liver Digest.

Ao realizar o isolamento celular por cultura de explante com o mesmo conjunto de amostras, este procedimento apresentou uma taxa de sucesso de 85% (6/7) (TABELA 2).

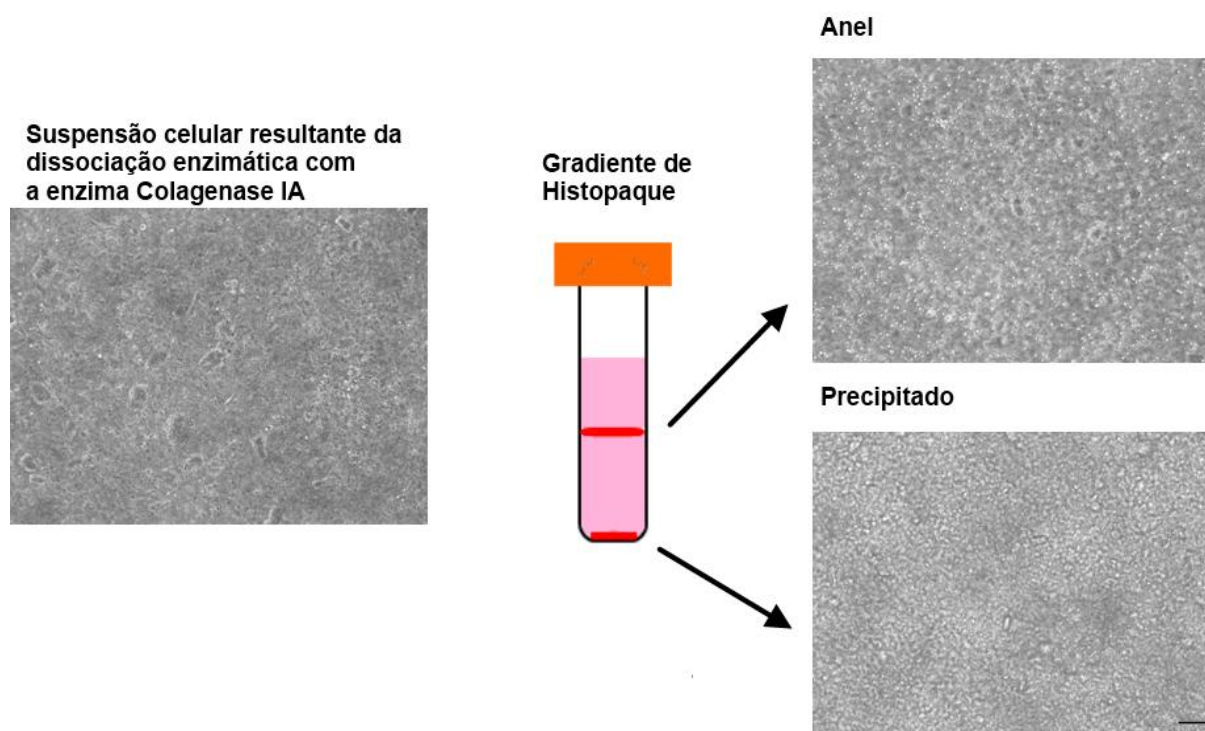


FIGURA 4 - Esquema da dissociação enzimática: suspensão celular e gradiente de Histopaque. Dados representativos da 5 dias de cultivo das suspensões celulares obtidas após procedimento de dissociação enzimática com a enzima Colagenase 1A e etapa de purificação com gradiente de densidade de Histopaque, frações anel e precipitado. Apesar das etapas de purificação celular, as suspensões celulares apresentaram muitos debrís. Barra de escala corresponde a 100 µm. FONTE: A autora (2011).

Ao agrupar os dados dos procedimentos de dissociação enzimática, a taxa de sucesso foi de 42%, enquanto que o procedimento de cultura de explante foi de 85%. Assim, em termos gerais, quanto ao comparativo das duas técnicas de isolamento celular, observou-se que o tempo decorrido entre o estabelecimento da cultura e do primeiro repique foi similar para ambos os processos de isolamento (FIGURA 5). Desta forma, optou-se para as etapas seguintes do projeto realizar o estabelecimento dos cultivos pelo método de cultura de explantes, por ser mais rápido o isolamento celular, cerca de 1h e 30 minutos, frente a 7 a 8 horas da dissociação enzimática. Além disso, o método de cultura de explantes é mais barato.

mais simples e sem o uso de enzimas e desta forma mais propenso a ser implantado para isolamento celular para uso clínico.

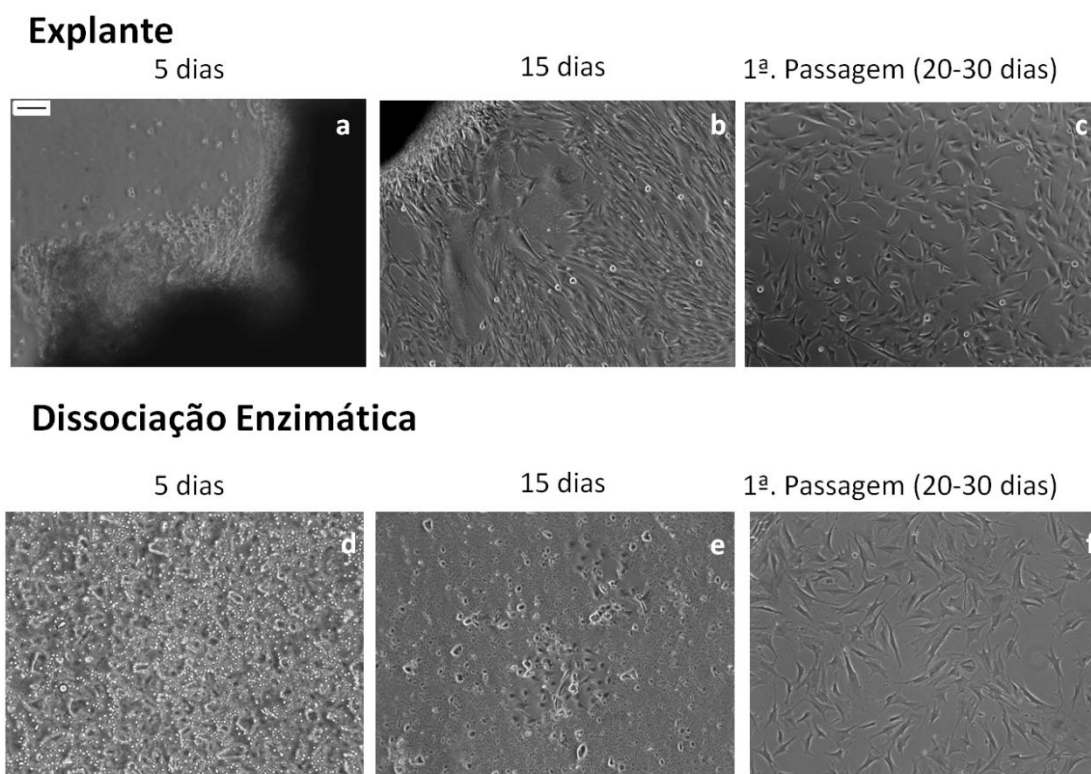


FIGURA 5 - Comparativo isolamento celular: Explante x dissociação enzimática.
Foi feito o comparativo entre o isolamento celular pela metodologia de cultura de explante (a-c) e dissociação enzimática (d-f), onde não se observou grandes alterações no desenvolvimento da cultura e tempo de realização do primeiro repique. Barra de escala corresponde a 30 μ m.
FONTE: a autora (2011).

5.2 ISOLAMENTO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS PELA TÉCNICA CULTURA DE EXPLANTE

Uma vez definido que o isolamento de células cardíacas humanas seria realizado pela técnica de cultura de explante, foram avaliadas duas regiões do coração como fontes das células cardíacas humanas, ventrículo ou aurícula direitos. As amostras de tecido cardíaco humano foram obtidas de 24 doadores adultos cadavéricos, 54% (n = 13) de sexo masculino 46% (n = 11) do sexo feminino. Dados

completos dos doadores encontram-se no APÊNDICE C. A idade média dos doadores foi de 39 anos \pm 12 (TABELA 3).

TABELA 3 - Taxa de sucesso no isolamento de células cardíacas para 24 amostras neste estudo.

Sexo do doador	Idade \pm DP	Aurícula	Ventrículo
54%M (n=13)	36 \pm 12	70% (7/10)	33% (4/12)
46% F (n=11)	43 \pm 11	70% (7/10)	33% (3/9)
100% T (n=24)	39 \pm 12	70 % (14/20)	33% (7/21)

M, doador de sexo masculino; F, doador de sexo feminino; T, total; DP, desvio padrão. N: número de amostras.

FONTE: a autora (2011).

O tempo de isquemia total foi de 21,5 \pm 9,1 horas (variação: 2,5 a 41,8 horas). Após 2 a 4 semanas de cultura, as células começaram a migrar a partir dos explantes (FIGURA 6-a e b), contudo com diferentes taxas de sucesso no isolamento celular de acordo com o tecido de origem (FIGURA 7).

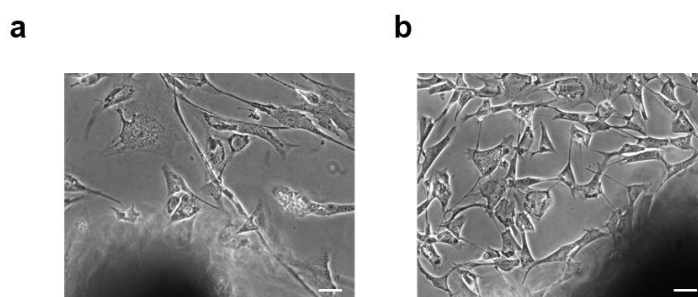


FIGURA 6 - Isolamento de células cardíacas humanas pelo método de cultura de explantes. Imagens de microscopia de contraste de fase mostram a migração de células a partir de fragmentos de explantes cardíacos humanos de aurícula direita (a) e ventrículo direito (b) de 2 a 4 semanas após o início de cultura primária. A Barra de escala corresponde a 30 μ m. FONTE: a autora (2011).

As células foram isoladas com sucesso após ser observada a migração de células a partir dos explantes até 30 dias após o estabelecimento das culturas primárias em 14/20 (70%) e 07/21 (33%) para a aurícula e ventrículo, respectivamente (TABELA 3), com significância estatística (FIGURA 7). Foram obtidas taxas de sucesso semelhantes para as culturas de explantes de doadores de

sexo masculino ou feminino (TABELA 3). Entretanto, o isolamento de células foi menos eficiente para os grupos de doadores com idade mais avançada do que para os doadores mais jovens, para as amostras do ventrículo. A taxa de sucesso para o isolamento de células de amostras do ventrículo direito era de 50% para os doadores mais jovens entre 21 e 30 anos, mas de apenas 17% de doadores mais velhos, entre 51 e 60 anos. Em contrapartida, para os doadores com idades entre 31 e 50 anos foram observadas as maiores taxas de sucesso para o isolamento de células de amostras aurícula. Foram obtidas taxas de sucesso de 90% para doadores com idades entre 31 a 40 anos e 100% para doadores com idades entre 41 a 50 anos. Contudo, as taxas de sucesso foram menores (50%) para amostras de doadores de aurícula entre as idades de 21 e 30 anos ou entre as idades de 51 e 60 anos (FIGURA 7). Estes dados sugerem que a população total de células aurícula-derivadas (TAD) pode ser uma fonte mais adequada de células cardíacas do que a população de células do ventrículo direito.

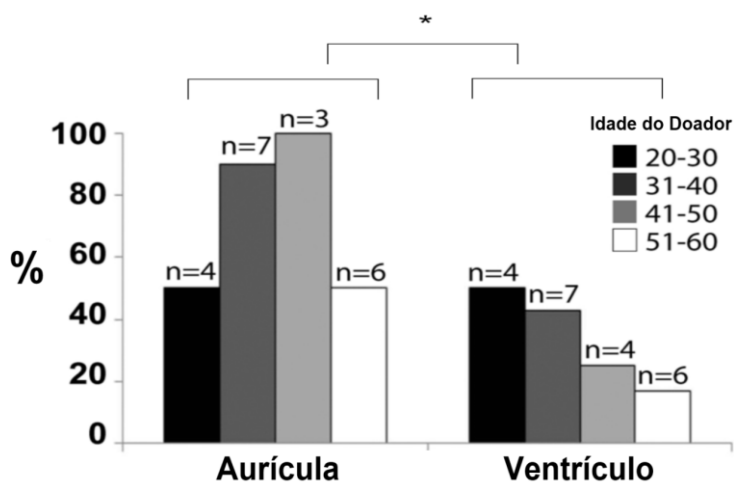


FIGURA 7 - Taxa de sucesso de isolamento de células cardíacas humanas.

A taxa de sucesso é mostrada em função da faixa de idade do doador e tecido de origem. As barras indicam as faixas de idade. O eixo das ordenadas indica o percentual de sucesso no isolamento celular para aurícula e ventrículo. O n corresponde ao número de doadores para cada faixa e é indicado no topo de cada barra. * $p < 0,05$.

FONTE: a autora (2011).

5.3 CÉLULAS DERIVADAS DE AURÍCULA E CÉLULAS DERIVADAS DE VENTRÍCULO SÃO HETEROGÊNEAS E EXPRESSAM, ENTRE OUTROS, MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A população de células cardíacas isoladas de explante de aurícula ou ventrículo foram caracterizadas através da realização de RT-PCR e ensaios de citometria de fluxo. Marcadores de CTM e pericitos como ALPL, CD44, e actina de músculo liso (ACTA2), foram encontrados nas amostras de células, como demonstrado por RT-PCR (FIGURA 8). Da mesma forma, foi observada a expressão de marcadores de miofibroblastos, como fator transformador de crescimento beta 1 (TGF β 1) e caderina 11 (Cad11a) e marcadores de fibroblastos, como colágeno 1a (Col1A) e a proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1) (FIGURA 8). Assim, as populações de células derivadas de culturas de explantes são heterogêneas quanto à expressão de marcadores em nível de transcritos avaliados por RT-PCR.

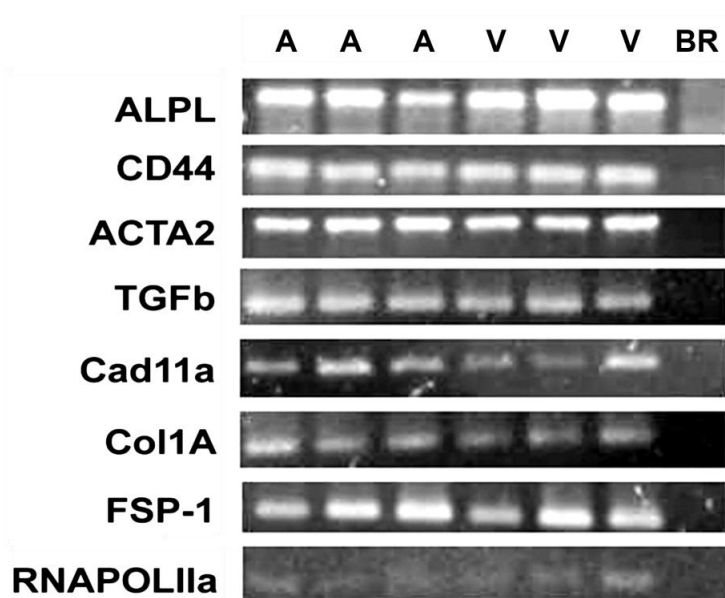


FIGURA 8 - Caracterização de células derivadas de aurícula e ventrículo por RT-PCR. A expressão de marcadores de CTM/pericitos (ALPL, CD44, ACTA2), miofibroblastos (TGF- β , Cad11a) e fibroblastos (FSP-1, col1a) e a expressão do gene constitutivo RNA Pol IIa foram avaliados por RT-PCR com 3 doadores independentes na passagem 4. Amostras são de células derivadas de aurícula direita (A) ventrículo direito (V) e branco sem adição de ácido nucléico (BR). FONTE: a autora (2011).

As populações celulares derivadas de aurícula e ventrículo também foram avaliadas em termos de expressão de marcadores por citometria de fluxo. Células derivadas de aurícula apresentaram maior expressão de CD90 e de fosfatase alcalina (ALPL), embora as quantidades de CD105, CD117 e CD140b foram semelhantes em ambas as populações (FIGURA 9). A população derivada de aurícula pode ser uma fonte mais adequada de células cardíacas do que o ventrículo direito pois além de apresentar maior quantidade de células positivas para a fosfatase alcalina, seu sucesso de isolamento é maior. Por essa razão, nos ensaios posteriores foram utilizadas células derivadas de aurícula.

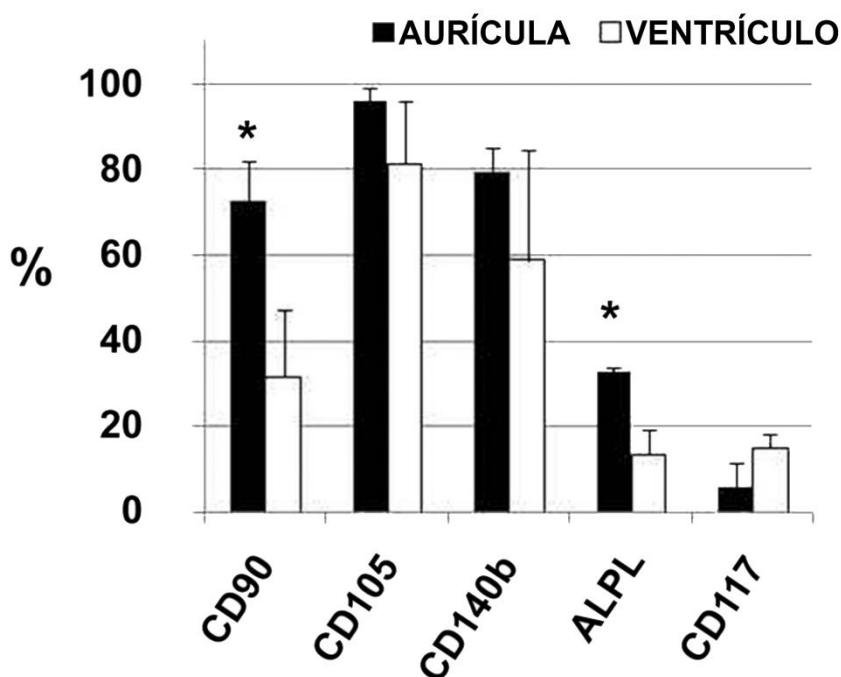


FIGURA 9 - Caracterização de células derivadas de aurícula e ventrículo por citometria de fluxo. A expressão de marcadores de pericitos (ALPL, CD140b), CTM (CD90 e CD105) e progenitor cardíaco (CD117) foram avaliados por citometria de fluxo com amostras provenientes de 3 doadores independentes na passagem 4. * $p < 0.05$.
FONTE: a autora (2011).

5.4 Expressão de fosfatase alcalina pelas células cardíacas humanas

Através da citometria de fluxo, foi possível avaliar que as células cardíacas humanas derivadas de aurícula pela técnica de explante expressam a enzima fosfatase alcalina. Foi verificada a expressão de $21,7 \pm 6,2\%$ ($n = 6$). Além disso, para confirmar sua expressão, foram utilizadas outras metodologias. Foi feito extrato protéico de células cardíacas humanas derivadas de aurícula e avaliado o padrão de banda de proteínas (FIGURA 10) e depois foi realizada a avaliação da expressão de fosfatase alcalina por western blot (FIGURA 11) para amostras provenientes de 2 doadores. O western blot apresentou uma banda de peso molecular entre 45 kDa e 66 kDa, presumivelmente correspondente a fosfatase alcalina de 57kDa.

Também foi realizada a análise *in situ* para avaliar a expressão da fosfatase alcalina nas células cardíacas humanas. Este ensaio foi padronizado para diferentes tempos, e para 30 minutos observou-se a marcação de cerca de 20% da população celular, indicando a presença de células positivas para a fosfatase alcalina (FIGURA 12).

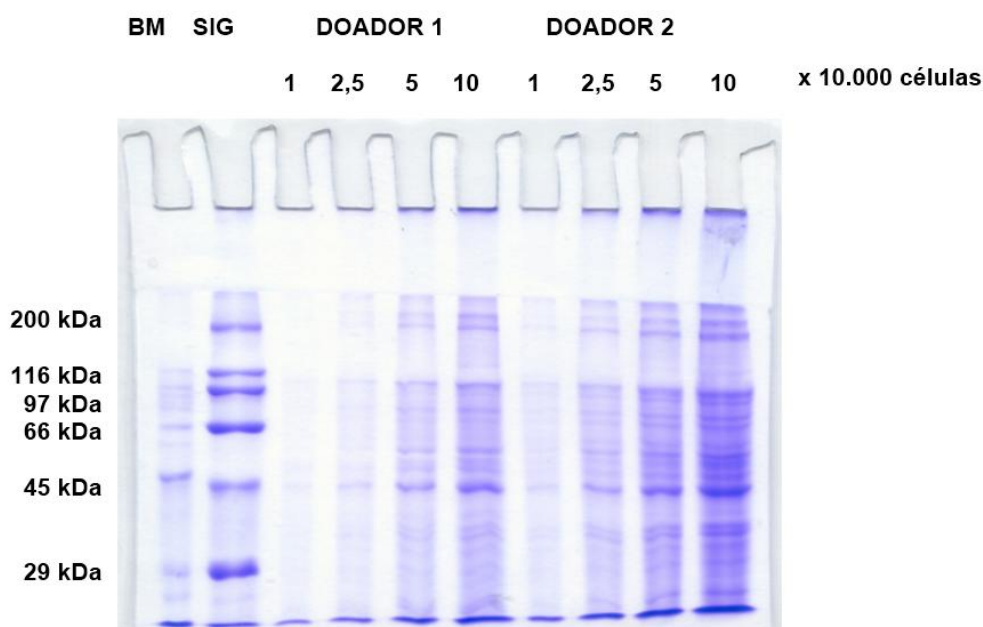


FIGURA 10 - Padrão de Proteínas em extratos de células cardíacas humanas.

Por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), o padrão de proteínas de células cardíacas humanas provenientes de aurícula foi avaliado para doador 1 e doador 2, em quantidades de 1, 2,5, 5 e 10×10^4 células. O padrão de Peso molecular (BM) utilizado foi o Bench Marker (Invitrogen) e também o padrão de peso molecular da Sigma (SIG).

FONTE: a autora (2011).

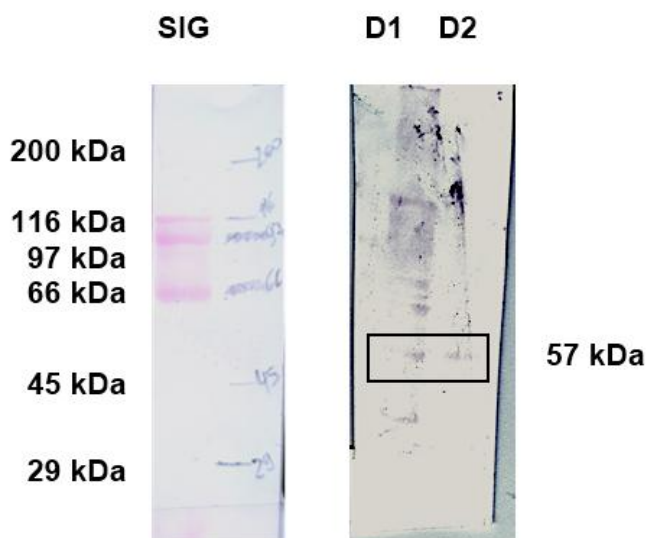
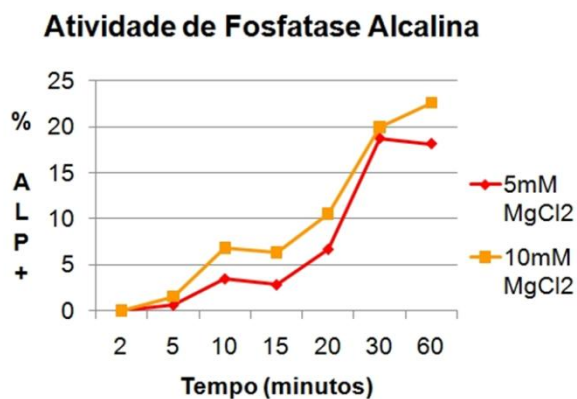


FIGURA 11 - Expressão de ALPL por Western Blot.

Expressão da proteína fosfatase alcalina por western blot. Para doador 1 (D1) e doador 2 (D2) foi observada a presença de banda entre 45 kDa e 66 kDa, presumivelmente correspondente a fosfatase alcalina, 57kDa.

FONTE: a autora (2011).

a



b

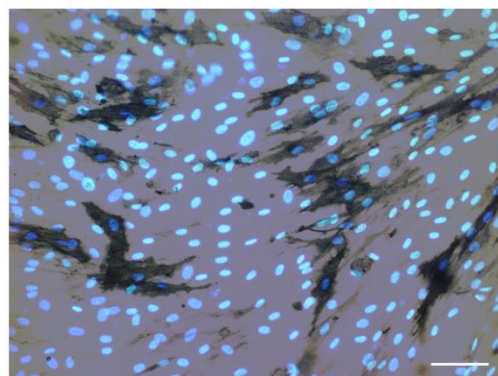


FIGURA 12 - Atividade *in situ* de fosfatase Alcalina em células cardíacas humanas.

A atividade *in situ* da fosfatase alcalina foi avaliada em cultivos de células cardíacas humanas derivadas de aurícula num curso temporal de até 60 minutos de reação (a) com uso de tampão de reação com 5 ou 10 mM de MgCl₂. Exemplos de marcação *in situ* (b). Barra de escala corresponde a 110 μ m.

FONTE: a autora (2011).

5.5 Purificação de células ALPL+ com o uso de micropérolas magnéticas

A partir das amostras de células cardíacas totais isoladas de aurícula (TAD), foi obtida população celular enriquecida para a expressão de fosfatase alcalina tecido não específica (ALPL), com o uso de microesferas magnéticas revestidas com anticorpos contra ALPL. A purificação resultou em uma população celular enriquecida para a expressão de ALPL de $86,4\% \pm 6,2$ ($n = 3$) (FIGURA 13). Contudo, a população celular que não aderiu as micropérolas magnéticas na primeira etapa do processo de purificação celular e que a princípio deveria ter sido depletada de células positivas para a fosfatase alcalina ainda apresentava grande quantidade de células ALPL+ $41,0\% \pm 10,3$ ($n = 3$). Desta forma, essa população celular não foi utilizada nas análises posteriores e decidiu-se utilizar as populações total (TAD) e ALPL+ para os ensaios subseqüentes.

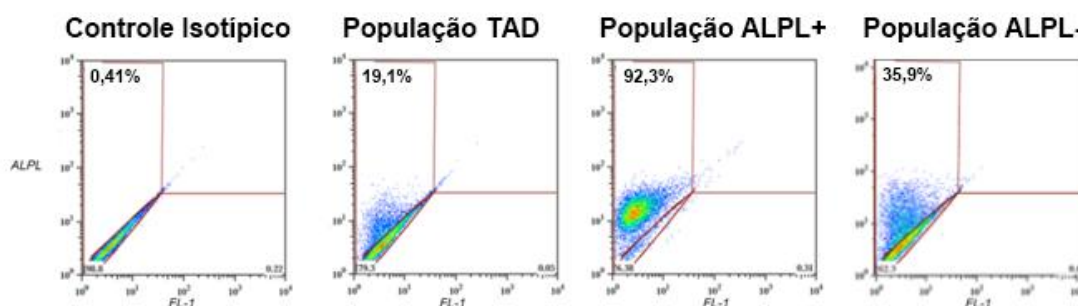


FIGURA 13 - Purificação de células positivas para ALPL com uso de micropérolas magnéticas. Controle isotípico, população total de células derivadas de aurícula (TAD) e população enriquecida para fosfatase alcalina (ALPL+) e população negativa para fosfatase alcalina (ALPL-) por separação por micropérolas magnéticas e avaliação por citometria de fluxo, experimento representativo. FONTE: a autora (2011).

5.6 Células ALPL+ possuem as características e potencial de diferenciação semelhante à MSC

Em seguida, foi avaliada a expressão de marcadores de células perivasculares, células endoteliais e células tronco-mesenchimais nas células TAD e ALPL+.

Não houve diferenças na expressão CD140b e nestina (FIGURA 14 a). No referente a expressão de marcadores endoteliais, CD34 foi expresso em cerca de 15% das células, fator de Von Willebrand (vWF) foi expresso em menos de 10% das células e outros marcadores endoteliais, como CD133 e CD31, não foram detectados em qualquer das amostras analisadas (FIGURA 14 a).

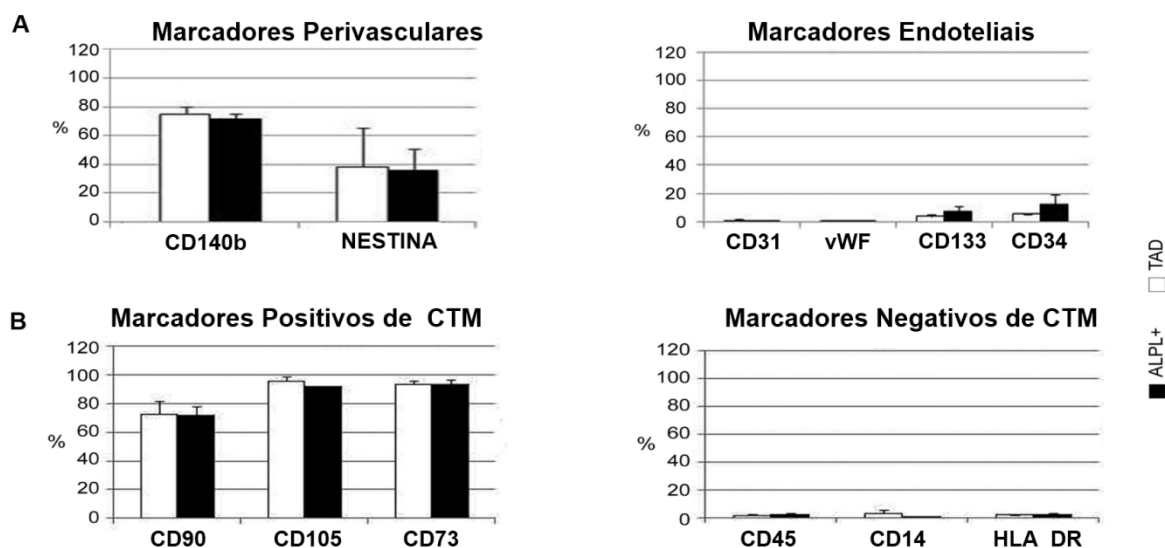


FIGURA 14 - Imunofenotipagem das células cardíacas humanas. Marcadores de células perivasculares, de endotélio (A) e marcadores positivos e negativos de células tronco mesenchimais (CTM) (B) foram avaliados por citometria de fluxo na população total de células derivadas de aurícula (TAD) e população enriquecida para fosfatase alcalina (ALPL+). Dados são expressos em termos de médias e erro padrão, n=3. Fator de Von Willebrand (vWF). *p<0.05. FONTE: a autora (2011).

Em seguida, avaliou-se a expressão de marcadores de células-tronco mesenchimais (CTM) Ambas TAD e ALPL+ expressavam os marcadores positivos para as células-tronco mesenchimais, como CD90, CD105, CD73, e nenhuma dessas populações de células expressavam marcadores negativos, tais como CD45, CD14 e HLA-DR (FIGURA 14 b). Desta forma, estas populações de células do coração humano, tem imunofenótipo semelhante à de CTM.

A diferenciação de células TAD e ALPL+ em osteoblastos, adipócitos e condroblastos foi induzida. Ambas as populações foram capazes de diferenciar

nestas três linhagens, indicando que células-tronco mesenquimais estão presentes em ambos os TAD e ALPL+, como mostrado por microscopia de contraste de fase (FIGURA 15) e citoquímica (FIGURA 16 a). A expressão de FABP4, colágeno 1a e colágeno II, marcadores específicos dos adipócitos, osteoblastos e condroblastos, respectivamente, foi analisada por q-PCR (FIGURA 16 b). Os níveis de RNAm de FABP4, colágeno 1a e colágeno II foram maiores nos cultivos enriquecidos para ALPL do que em culturas TAD.

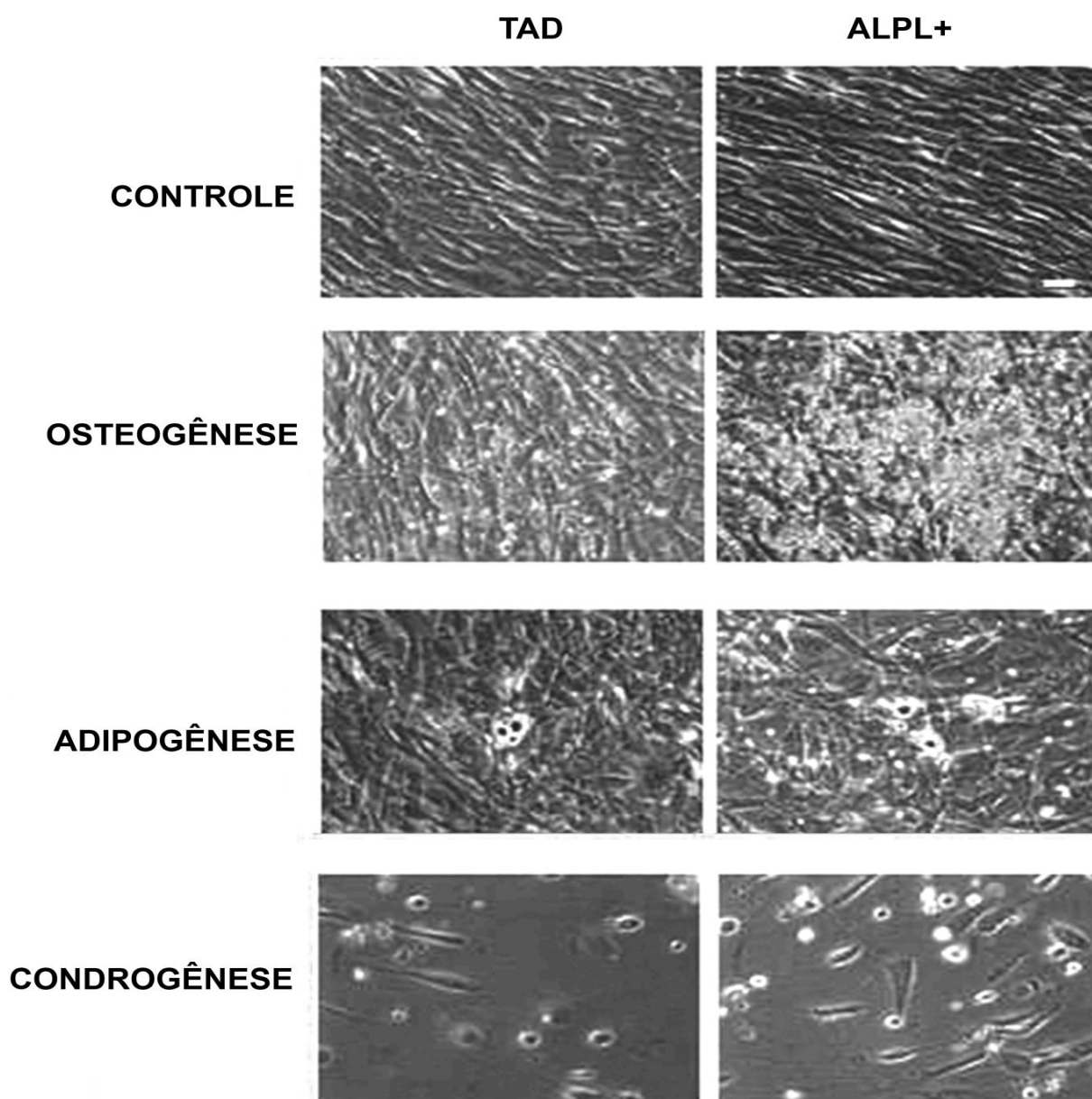


FIGURA 15 - Diferenciação em linhagens mesenquimais.

Diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos foi induzida na população total de células derivadas de aurícula (TAD) e na população enriquecida para fosfatase alcalina (ALPL+) por 21 dias. Imagens de microscopia em contraste de fase indica que ocorreu diferenciação celular. Os dados correspondem a análise de 3 doadores. Barra de escala corresponde a 15 μ m

FONTE: a autora (2011).

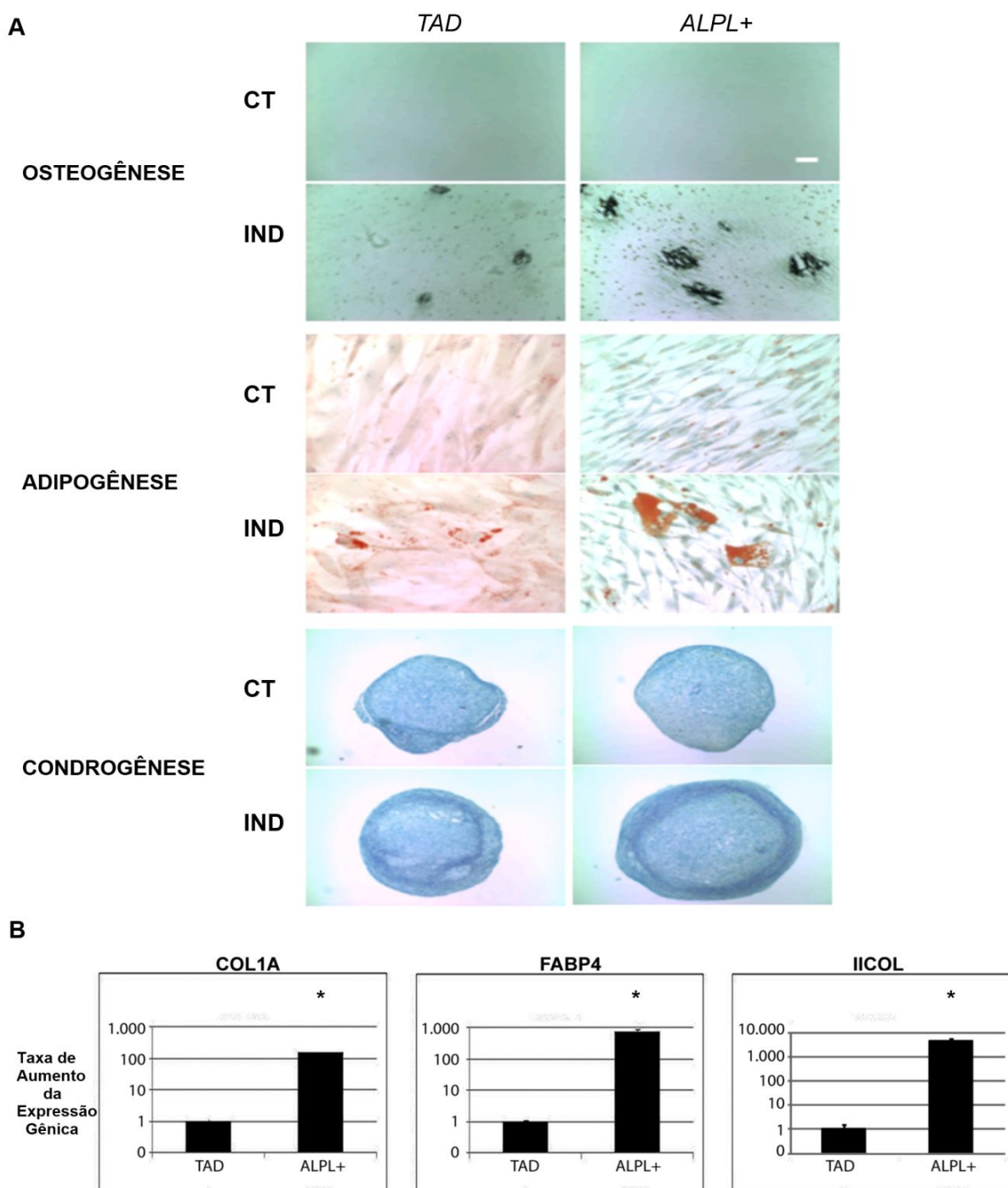


FIGURA 16 - Diferenciação em linhagens mesenquimais por citoquímica e q-PCR. Diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos foi induzida na população total de células derivadas de aurícula (TAD) e na população enriquecida para fosfatase alcalina (ALPL+) por 21 dias. Imagens de citoquímica (a) indicam que ocorreu diferenciação celular. A expressão gênica de marcadores de diferenciação celular foi quantificada por q-PCR (b). Os dados correspondem a análise de 3 doadores. A Barra de escala para adipogênese é de 15 μ m (c) e para osteogênese e condrogênese é de 60 μ m (c). Controle (CT) e induzido. (IND).
 FONTE: a autora (2011).

Oil red O foi utilizada para a quantificação da diferenciação adipogênica. Foi observado $48,5\% \pm 16,1$ e $69,6\% \pm 5,5$ de células diferenciadas em TAD e ALPL+.

respectivamente, ainda que não foi diferente estatisticamente (FIGURA 17 a). Como avaliado pela morfologia, as células que diferenciaram em adipócitos a partir TAD apresentaram vacúolos menores enquanto ALPL+ apresentou vacúolos grandes, arredondados e ricos em gotas lipídicas. Desta forma, a área correspondente aos vacúolos ricos em lipídeos corados por Oil red O foi quantificada em unidades arbitrárias de pixels de 3 doadores independentes. Foi observado um aumento da área correspondente aos vacúolos ricos em lipídeos para células ALPL+ em comparação com TAD, com significância estatística (FIGURA 17 b). Esses dados indicam que a partir da população ALPL+ é possível induzir a diferenciação de adipócitos mais maduros do que na população celular total derivada de aurícula (TAD) para os 21 dias de cultivo avaliados.

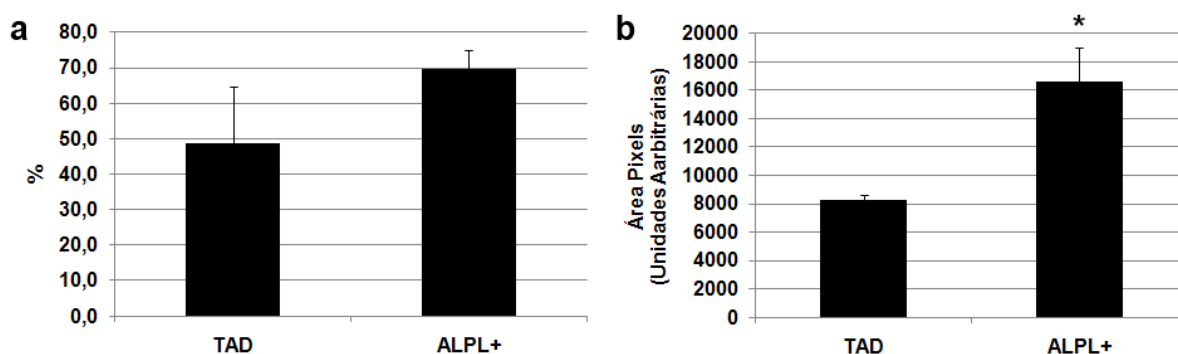


FIGURA 17 - Quantificação da diferenciação adipogênica.

Percentagem de células diferenciadas (a) e quantificação da área correspondente a vesículas ricas em lipídeos corados com o corante de lipídeos Oil Red O (b) para a população total de células derivadas de aurícula (TAD) e na população enriquecida para fosfatase alcalina (ALPL+) induzida a diferenciação por 21 dias. Dados de 3 doadores independentes. * $p < 0.05$.

FONTE: a autora (2011).

5.7 Expressão de marcadores cardíacos e possível comprometimento com linhagem cardíaca

Foi avaliada a expressão de marcadores cardíacos, para determinar se as células cardíacas apresentam sua expressão (FIGURA 18). Ambas as populações celulares expressaram VEGF, fator de crescimento endotelial (Formiga, Pelacho *et al.*, 2010), GATA4 um marcador cardiomiogênico precoce e CD117 um marcador de

células progenitoras cardíacas (BEARZI, ROTA *et al.*, 2007). As células ALPL+ expressaram troponina T, um marcador de linhagem cardíaca, e ABCG2, (HIERLIHY, SEALE *et al.*, 2002; TAKAHASHI, FUKUSHIMA *et al.*, 2008; YAMAHARA, FUKUSHIMA *et al.*, 2008) em duas de 3 amostras analisadas.

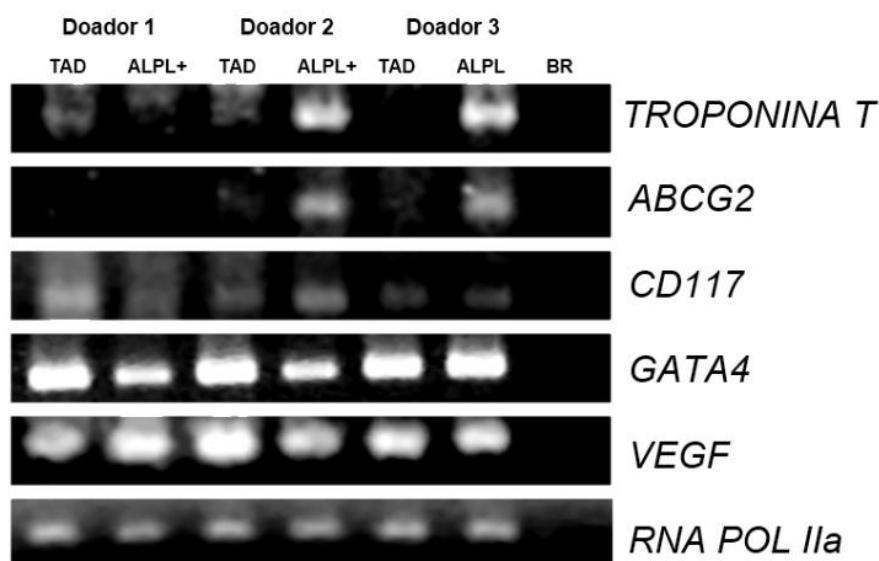


FIGURA 18 - Expressão de marcadores cardíacos.

Foi analisada a expressão de marcadores de linhagens cardíacas GATA4, CD117, ABCG2 e troponina T, o fator de crescimento VEGF e o gene constitutivo RNA Pol IIa por RT-PCR para 3 amostras independentes de células totais derivadas de aurícula (TAD) e células enriquecidas para fosfatase alcalina (ALPL), e para controle sem adição de alvo de DNA, branco (BR).

FONTE: a autora (2011).

5.8 Separação celular por citometria de fluxo

Com a aquisição pelo Instituto Carlos Chagas de um citômetro de fluxo com sistema de separação celular que entrou em funcionamento em 2010, foi padronizada a técnica de separação celular das células ALPL+ com o uso deste equipamento, em substituição a técnica de separação com micropérolas magnéticas, utilizada na primeira parte deste estudo. Apesar de apresentar vantagens, como maior pureza e possibilidade de separação de amostras com vários marcadores, o sistema é de complexa operação e várias condições tiveram que ser padronizadas a

fim de obter células viáveis após o processo, com pureza adequada e número de células suficiente para estabelecimento de cultivos com finalidade de realização dos demais ensaios. As populações celulares separadas foram ALPL+ e ALPL-, em comparação com a população TAD, como demonstradas (FIGURA 19). Desta forma a população TAD e as populações purificadas ALPL+ e ALPL-, com pureza superior a 90%, foram as populações celulares definidas para a realização das demais etapas deste trabalho.

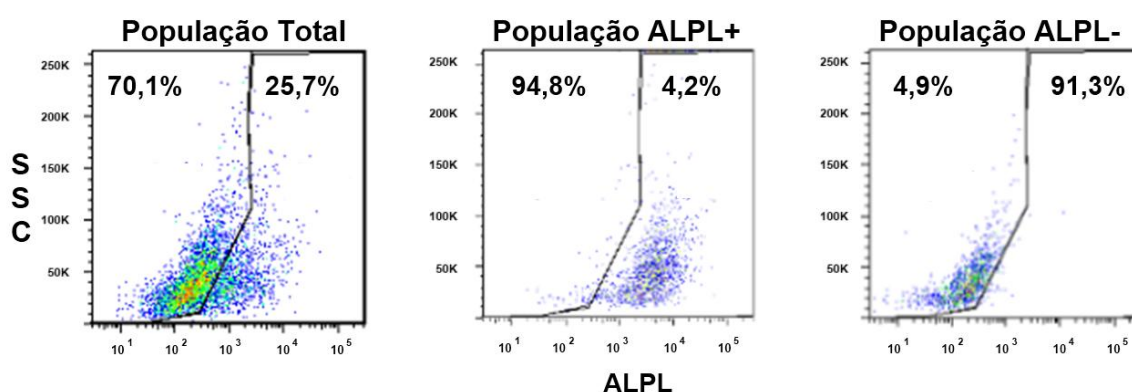


FIGURA 19 - Purificação de células positivas para ALPL por citometria de fluxo.

Dados representativos do índice de pureza das populações celulares separadas com o uso de citômetro de fluxo FACSARIA II. População inicial de células totais derivadas de aurícula (TAD) e após processo de purificação celular são demonstradas população de células enriquecidas para fosfatase alcalina (ALPL+) e população de células depletadas para fosfatase alcalina (ALPL-).

FONTE: a autora (2011).

5.9 Formação de dutos endoteliais em Matrigel™

A partir das células purificadas por citômetro de fluxo com sistema de separação celular foi avaliado também o potencial de formação de dutos endoteliais. Para verificar a formação de túbulos capilares foram realizadas culturas em substrato Matrigel™ (BD-Biosciences) seguidas de observações nos tempos de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 e 48 horas em microscópio invertido (SENEGAGLIA *et al.*, 2010). Observou-se um comportamento não homogêneo entre as amostras de 3 doadores independentes avaliados neste ensaio (dados sumarizados na TABELA 4). Não se

observou um perfil de formação de dutos em Matrigel™ em função do processo de purificação celular. De uma forma geral os dutos formaram-se entre 2 a 4 horas para todas as amostras, exceto para TAD do doador 3 (FIGURA 20). Todas as populações apresentaram dutos em 10 e 12 horas, contudo esses dutos se desfaziam com 24 ou 48 horas, indicando assim a ausência de células endoteliais, exceto para duas amostras, ALPL- doador 1 (FIGURA 21) e ALPL+ para doador 2 (FIGURA 22).

TABELA 4 - Ensaio de formação de dutos em Matrigel™.

	TAD			ALPL+			ALPL-		
	Doador 1	Doador 2	Doador 3	Doador 1	Doador 2	Doador 3	Doador 1	Doador 2	Doador 3
2 horas	+	-	-	+	-	+	+	-	+
4 horas	+	+	-	+	+	+	+	+	+
6 horas	+	+	-	+	+	+	+	+	+
8 horas	+	+	-	+	+	+	+	+	+
10 horas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12 horas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24 horas	+	-	-	-	+	+	+	-	+
48 horas	-	-	-	-	+	-	+	-	-

Presença (+) ou ausência (-) de dutos são indicados para amostras TAD, ALPL+ e ALPL- de três doadores independentes. População inicial de células totais derivadas de aurícula (TAD) população de células enriquecidas para fosfatase alcalina (ALPL+) e população de células depletadas para fosfatase alcalina (ALPL-).

FONTE: a autora (2011).

TAD

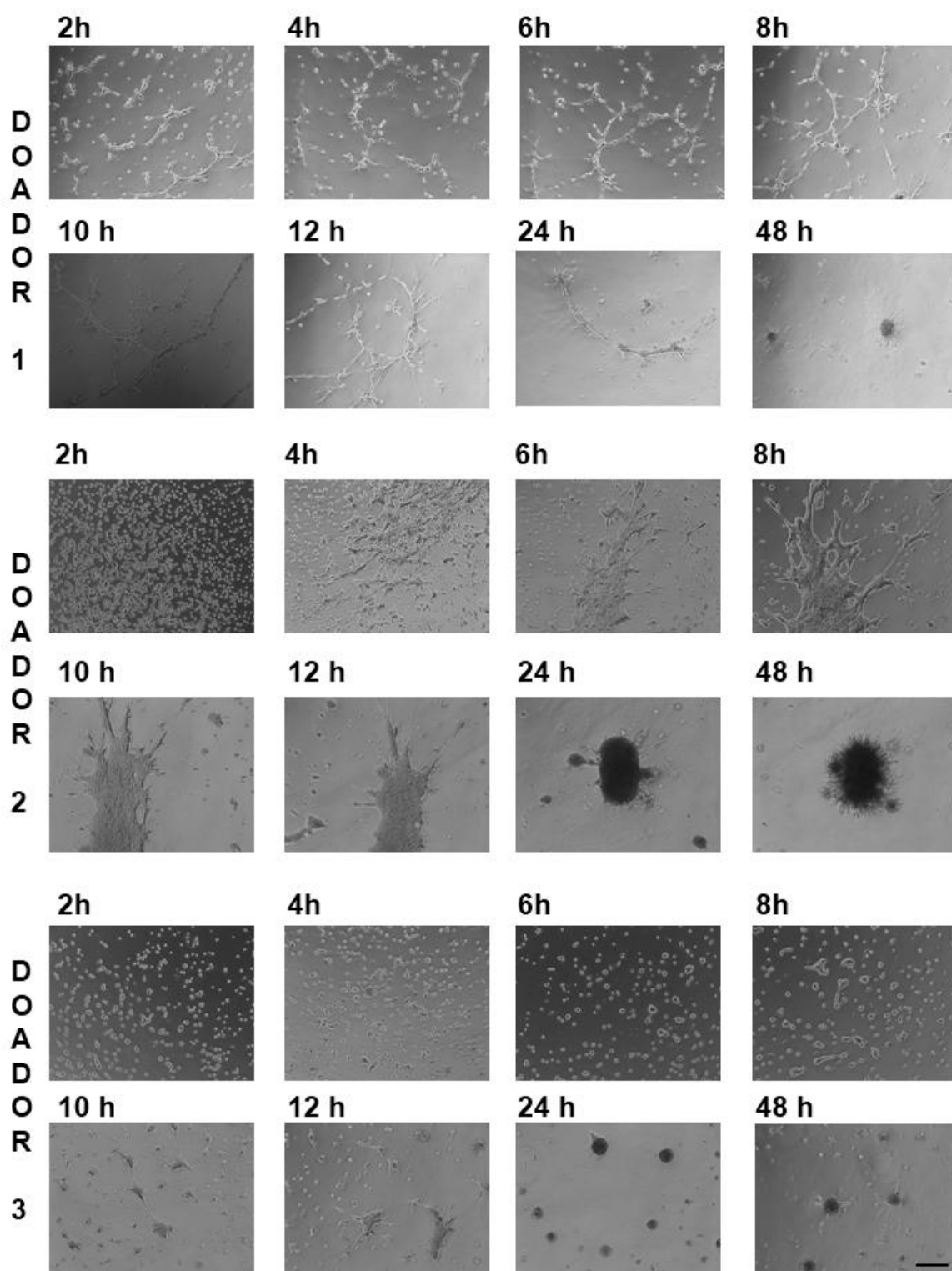


FIGURA 19 - Formação de dutos em cultura de Matrigel™ amostras TAD. Células cardíacas totais derivadas de aurícula (TAD) foram cultivadas por até 48 horas em Matrigel™ para visualização da formação de dutos. Amostras de 3 doadores independentes. Barra de escala corresponde a 200 μ m. FONTE: a autora (2011).

ALPL -

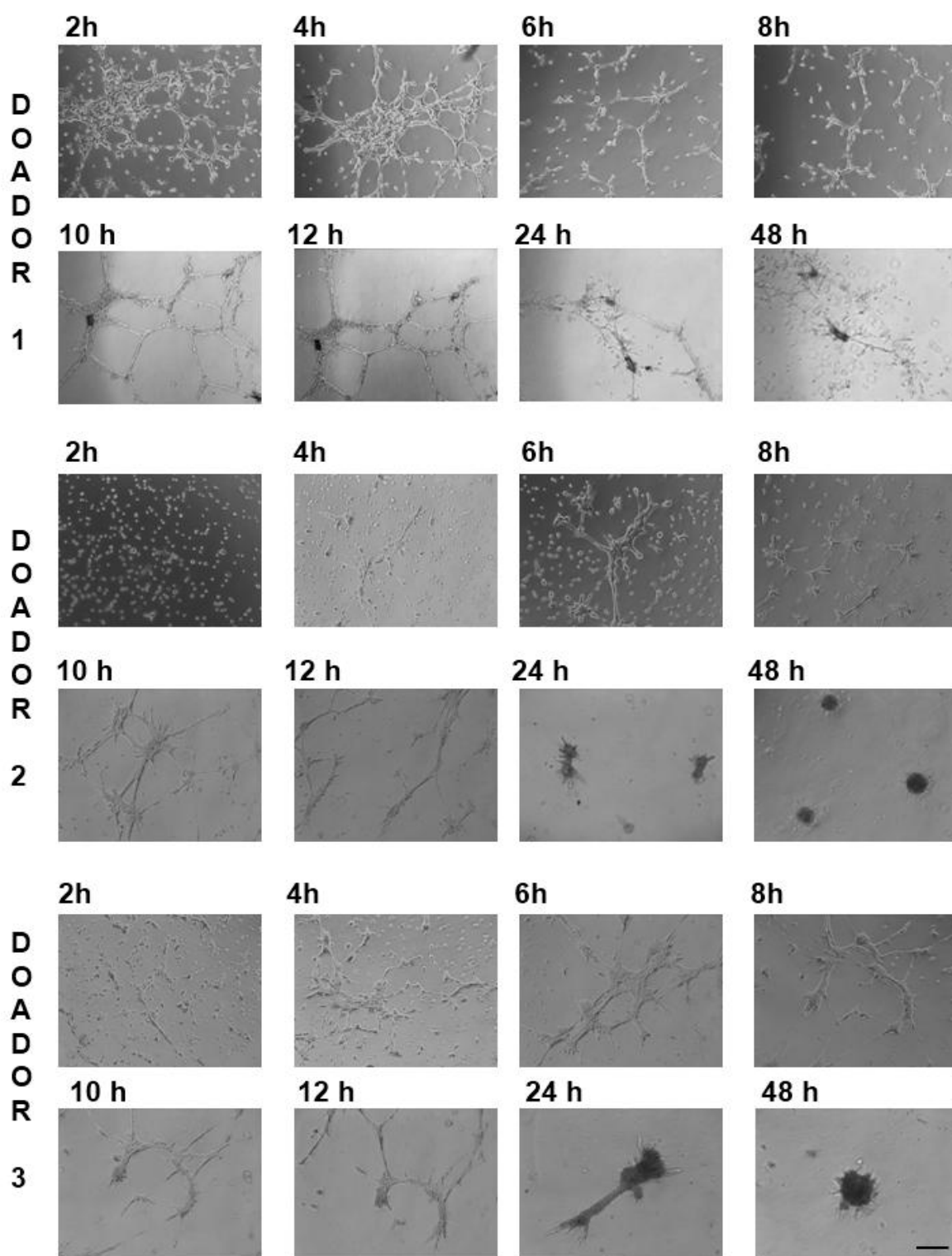


FIGURA 20 - Formação de dutos em cultura de Matrigel™ amostras ALPL-. Células cardíacas negativas para enzima fosfatase alcalina (ALPL-) foram cultivadas por até 48 horas em Matrigel™ para visualização da formação de dutos. Amostras de 3 doadores independentes. Barra de escala corresponde a 200 μ m. FONTE: a autora (2011).

ALPL+

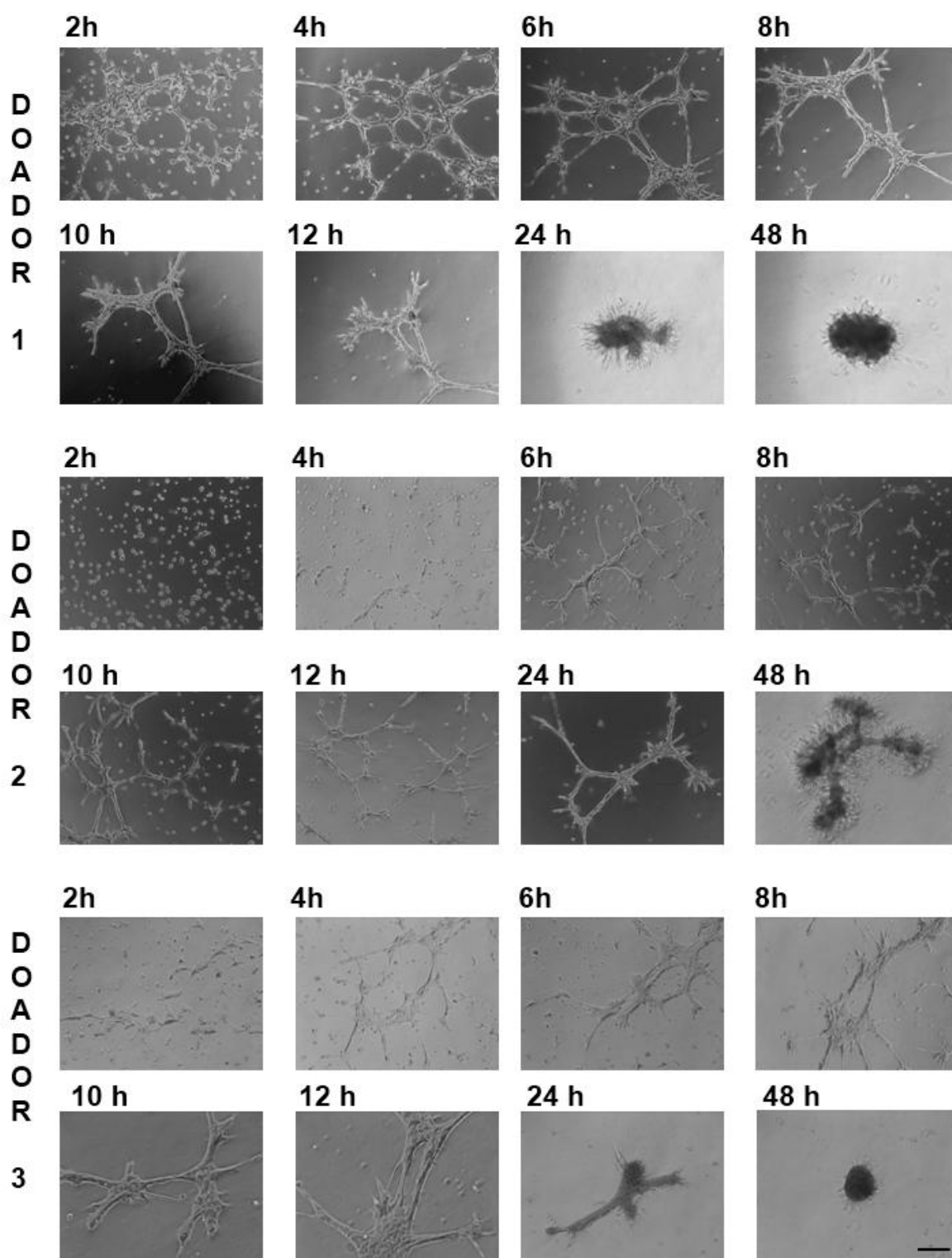


FIGURA 21 - Formação de dutos em cultura de Matrigel™ amostras ALPL+. Células cardíacas positivas para enzima fosfatase alcalina (ALPL+) foram cultivadas por até 48 horas em Matrigel™ para visualização da formação de dutos. Amostras de 3 doadores independentes. Barra de escala corresponde a 200 μ m. FONTE: a autora (2011).

5.10 Indução da diferenciação em cardiomiócitos

Quanto aos ensaios de diferenciação celular em cardiomiócitos, foi testado o protocolo descrito por Smits e colaboradores (SMITS, VAN VLIET *et al.*, 2009). Este levou a morte celular antes da avaliação da diferenciação celular, em pelo menos 3 ensaios independentes, com o tempo de 21 dias de cultivo.

Desta forma, foi utilizado o protocolo descrito por Galvez e colaboradores (GÁLVEZ, COVARELLO *et al.*, 2009) para indução com 5-Azacitidina, 5% de soro fetal bovino e 2% de soro de cavalo por 5 dias. Foram avaliados marcadores cardíacos por imunofluorescência, como GATA4, NKX2.5, GATA6, MEF2C, troponina I e troponina T-C. Foi observada apenas a expressão de GATA4, aparentemente nuclear, nas culturas TAD, ALPL+ e ALPL- induzidas por 5 dias, para 2 doadores avaliados (FIGURA 23 e FIGURA 24), enquanto que para o 3º doador, não se observou a expressão de GATA4 mediante indução (FIGURA 25). Para os doadores 1 e 2 foi feita a quantificação do percentual de células positivas para GATA4 na ausência e presença da indução da diferenciação. Se observou que a indução aumentou a expressão de GATA4 para TAD, ALPL+ e ALPL- para o doador 1 (FIGURA 26a) e aumentou a expressão de GATA4 para TAD, ALPL+ para o doador 2 (FIGURA 26b) ao comparar células induzidas e não induzidas. Se observou diferença no percentual de células positivas para GATA4 ao comparar TAD com ALPL+ e ALPL- para o doador 1 e ALPL+ e ALPL- para o doador 2, para o grupo controle. A indução favoreceu o aumento do percentual de células GATA4, sem contudo ser verificada diferença entre TAD, ALPL+ e ALPL- (FIGURA 26).

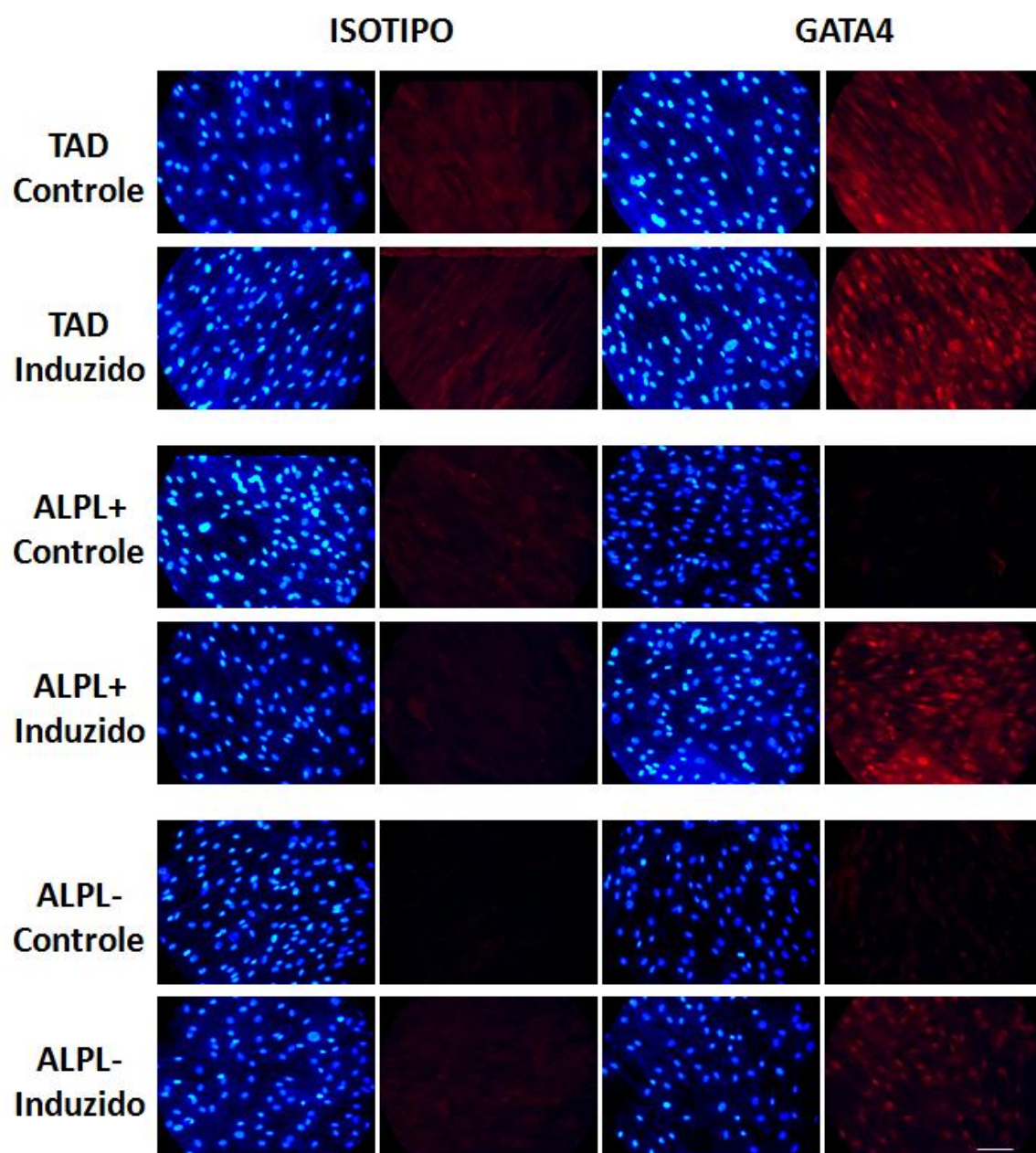


FIGURA 22 - Expressão de GATA4, doador 1.

Expressão do fator de transcrição GATA4 após 5 dias indução da diferenciação em cardiomiócitos..

Barra de escala corresponde a 80 μ m. População inicial de células totais derivadas de aurícula (TAD) população de células enriquecidas para fosfatase alcalina (ALPL+) e população de células depletadas para fosfatase alcalina (ALPL-).

FONTE: a autora (2011).

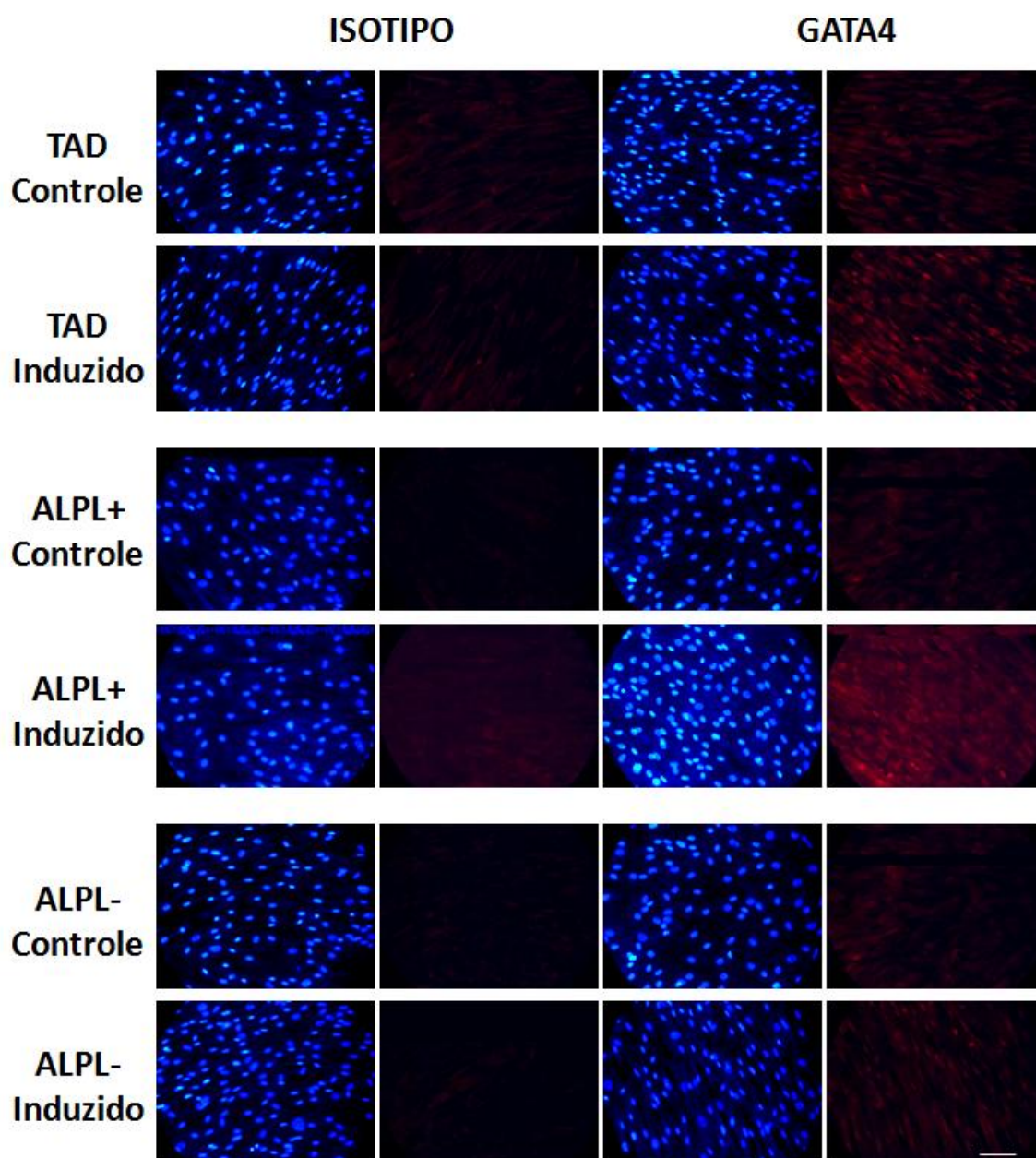


FIGURA 23 - Expressão de GATA4, doador 2.

Expressão do fator de transcrição GATA4 após 5 dias indução da diferenciação em cardiomiócitos.. Barra de escala corresponde a 80 μ m. População inicial de células totais derivadas de aurícula (TAD) população de células enriquecidas para fosfatase alcalina (ALPL+) e população de células depletadas para fosfatase alcalina (ALPL-).

FONTE: a autora (2011).

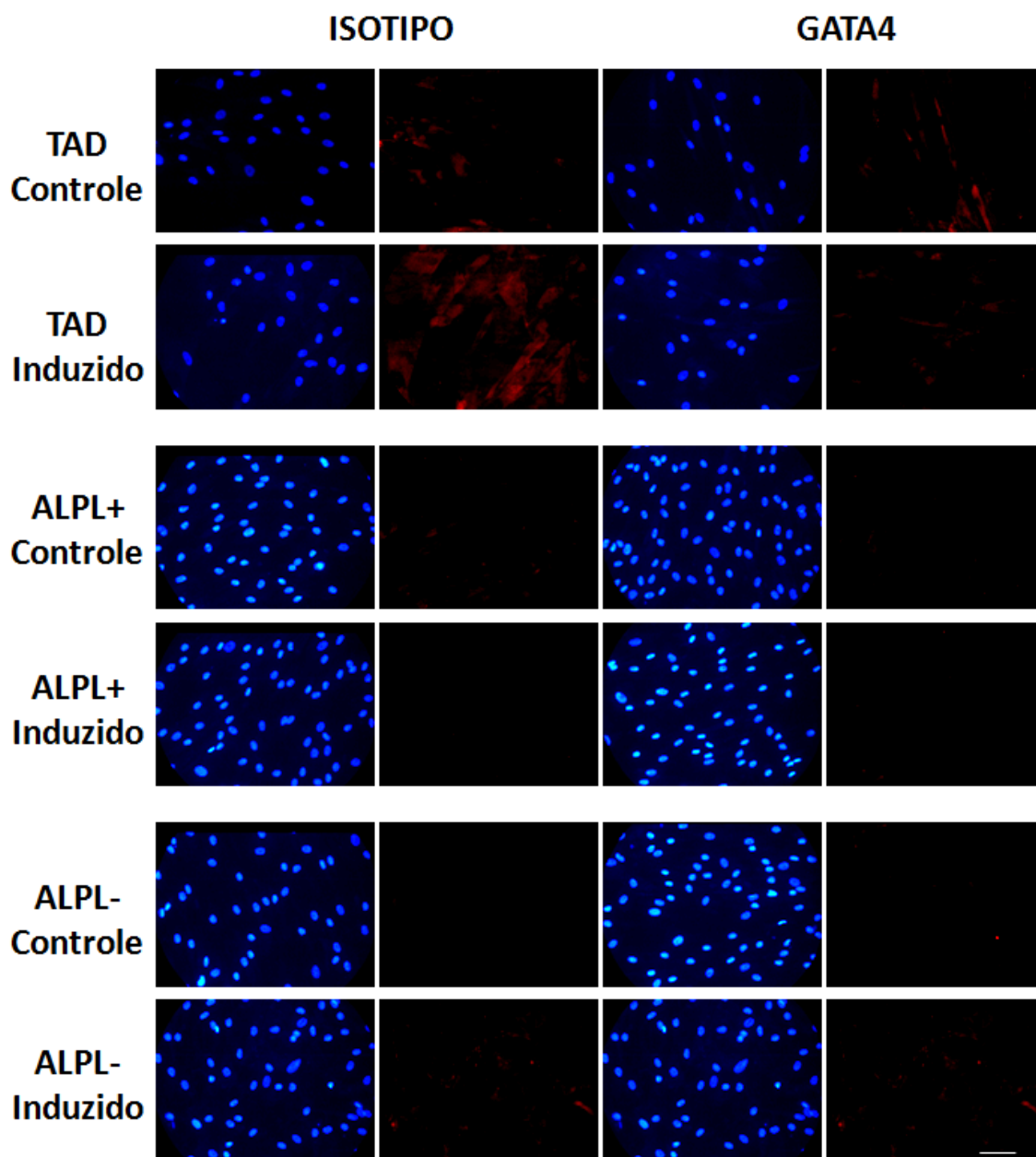


FIGURA 24 - Expressão de GATA4, doador 3.

Expressão do fator de transcrição GATA4 após 5 dias indução da diferenciação em cardiomiócitos.. Barra de escala corresponde a 80 μ m. População inicial de células totais derivadas de aurícula (TAD) população de células enriquecidas para fosfatase alcalina (ALPL+) e população de células depletadas para fosfatase alcalina (ALPL-).

FONTE: a autora (2011).

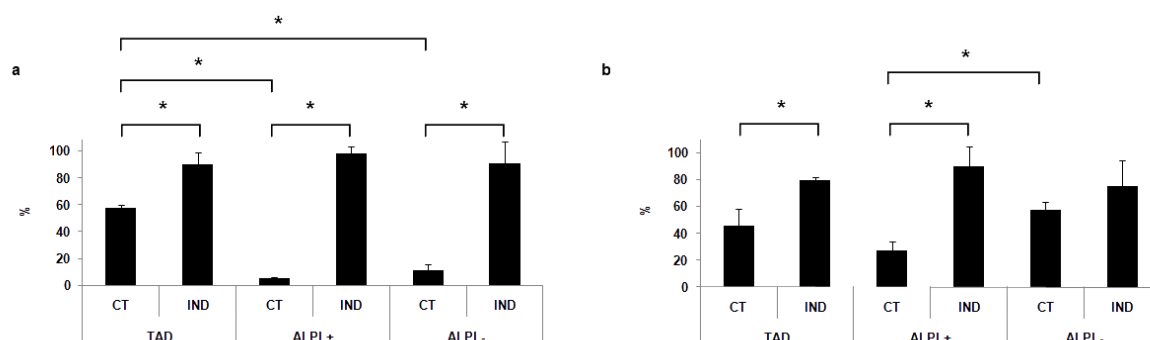


FIGURA 26 - Quantificação da expressão de GATA4.

Percentagem de células positivas para GATA4 quantificadas por contagem celular direta das células positivas para GATA4 após 5 dias de indução da diferenciação em cardiomiócitos. Doador 1 (a) e doador 2 (b) estão representados. População inicial de células totais derivadas de aurícula (TAD) população de células enriquecidas para fosfatase alcalina (ALPL+) e população de células depletadas para fosfatase alcalina (ALPL-). CT (controle) IND Induzido. * $p < 0.05$.

FONTE: a autora (2011).

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi isolar células progenitoras cardíacas humanas a partir de doadores cadáveres humanos adultos, com base na expressão de fosfatase alcalina tecido inespecífica. Nós mostramos, pela primeira vez, que uma população de células cardíacas enriquecidas para a expressão de fosfatase alcalina tecido não específica tinha o potencial de se diferenciar em linhagens mesenquimais. Mostramos também que células ALPL+ cardíacas expressam um repertório de marcadores cardíacos. Estas células podem, portanto, constituir uma população adequada para a avaliação como uma população de células progenitoras cardíacas para uso em terapias celulares.

A aurícula foi a fonte mais adequada de células progenitoras cardíacas. A taxa de sucesso para o procedimento de isolamento foi maior para o procedimento de isolamento celular utilizando aurícula como tecido de origem do que para as culturas isoladas do ventrículo. O rendimento do método de cultura de explantes foi compatível com o uso em pesquisa básica e foram necessárias cerca de duas a quatro semanas para isolar as primeiras células e o rendimento variou com a idade do doador. Entretanto, algumas modificações são necessárias para uso clínico em

terapia autóloga. Por exemplo, um banco de células cardíacas poderia ser estabelecido, isto tornaria mais fácil a obtenção de material para terapias celulares. De fato, há muitos relatos publicados sobre o isolamento de células residentes cardíacas. No entanto, na maioria dos casos, essas células foram isoladas a partir de modelos animais (BELTRAMI, BARLUCCHI *et al.*, 2003 e GALVEZ, SAMPAOLESI *et al.*, 2008) ou de material fresco obtido durante as biópsias de doadores com doenças cardíacas (MESSINA, DE ANGELIS *et al.*, 2004; BEARZI, ROTA *et al.*, 2007). A insuficiência cardíaca pode interferir com a homeostase do órgão, afetando a população de células progenitoras cardíacas putativas, como demonstrado por Gálvez *et al.* (GÁLVEZ, COVARELLO *et al.*, 2009). Assim a própria insuficiência cardíaca do paciente esgotaria a capacidade regenerativa de seus progenitores cardíacos autólogos e seria necessário o uso de transplante de células de doadores alogênicos. Levando em conta estes fatos, decidimos investigar a existência de CTM pela expressão do marcador ALPL em amostras humanas do coração doado a um banco de valvas cardíacas, o Banco de Homoenxertos Cardíacos Humanos da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba. Em bancos de válvulas, corações são processados para extração de válvulas e o músculo cardíaco saudável é descartado.

A fosfatase alcalina é um marcador de CTM na medula óssea, de células-tronco embrionárias, de células progenitoras neuronais, de pericitos progenitores de músculo esquelético de humanos e de células do endométrio semelhantes a CTM (DELLAVALLE, SAMPAOLESI *et al.*, 2007; LANGER, IKEHARA *et al.*, 2007; SCHWAB E GARGETT, 2007; O'CONNOR, KARDEL *et al.*, 2008; BATTULA, TREML *et al.*, 2009; SOBIESIAK, SIVASUBRAMANIYAN *et al.*, 2009). A fosfatase alcalina também é um marcador de células perivasculares, que acredita-se ser o nicho das CTM (DA SILVA MEIRELLES, CHAGASTELLES *et al.*, 2006; DA SILVA MEIRELLES, CAPLAN *et al.*, 2008). Nossos resultados indicam que células cardíacas ALPL+ podem constituir uma população residente de CTMs no coração, uma vez que os níveis de mRNA de marcadores de linhagem mesenquimal (osteoblastos, adipócitos e condroblastos) foram maiores em células ALPL+ do que em células TAD em células induzidas a se diferenciar. Estes dados são também corroborados pelo aumento de vesículas lipídicas em células ALPL+ induzidas a adipogênese.

Além disso, o nicho MSC deve ser considerado um fator chave para a medicina regenerativa. O uso de CTM isoladas do nicho cardíaco pode ser mais propenso a ter sucesso em terapias celulares para a insuficiência cardíaca.

Estudos prévios também identificaram células progenitoras cardíacas a partir da expressão de marcadores, como c-kit, ABCG2, sca-1, islet -1 e cardioesferas, como revisto por Gonzales et al. e Bollini et al. (GONZALES E PEDRAZZINI, 2009; BOLLINI, SMART *et al.*, 2010). Uma questão em aberto é se estes progenitores representam várias populações celulares distintas ou a mesma população celular. O elevado grau de variabilidade no fenótipo das células observadas pode ser decorrente dos métodos de isolamento, a composição do meio de cultura e idade dos doadores e a origem anatômica das células diferentes descritas nestes diversos estudos (GALVEZ, SAMPAOLESI *et al.*, 2008). De qualquer modo, existem evidências de que o nicho cardíaco contém células progenitoras com capacidade regenerativa. Células ALPL+ poderiam ser avaliadas para a regeneração do tecido cardíaco. Como a expressão de ALPL tem sido observada em precursores miogênicos no músculo esquelético, diferente de células satélites (DELLAVALLE, SAMPAOLESI *et al.*, 2007), essas células podem ter características semelhantes aos mesoangioblastos descritos tanto em músculo esquelético quanto em tecido cardíaco murino (GALVEZ, SAMPAOLESI *et al.*, 2008), assim como no tecido cardíaco humano de doadores com cardiomiopatia hipertrófica (GÁLVEZ, COVARELLO *et al.*, 2009).

No entanto, alguns estudos relatam uma ausência de detecção de ALPL em CTM de corações humanos (RIEKSTINA, CAKSTINA *et al.*, 2009). Esses resultados conflitantes podem refletir diferenças nos procedimentos de isolamento e cultivo celular. Em nosso trabalho, foram isoladas células através da técnica de cultura de explante a partir de doadores sem relato de comprometimento ou insuficiência cardíaca, que pode ter favorecido o isolamento de células ALPL+. Adicionalmente usamos um meio inicialmente descrito para o isolamento de pericitos de tecido muscular esquelético humano (DELLAVALLE, SAMPAOLESI *et al.*, 2007) e há o relato de que o cultivo aumenta a expressão de fosfatase alcalina em pericitos isolados de corações de mamíferos (LINDNER, BEHRENDTS *et al.*, 1998). Por outro lado, estudos anteriores foram feitos com digestão enzimática em amostras de doadores de coração com insuficiência cardíaca (RIEKSTINA, CAKSTINA *et al.*, 2009). Portanto, nosso protocolo poderia ter favorecido o isolamento de pericitos de

coração humano, selecionando as células ALPL+ através da cultura de células dos explantes. Contudo ensaios adicionais como a localização *in vivo* de células ALPL+ na posição perivascular em tecido cardíaco ou mesmo a co-expressão de outros marcadores de pericitos como 3G5, (SHI E GRONTHOS, 2003) entre outros, poderia elucidar essa questão.

Células ALPL+ podem exibir algum comprometimento com a diferenciação em linhagens cardíacas pois expressam GATA4, um gene mestre na diferenciação cardiomiogênica, e a isoforma cardíaca de troponina T, um marcador da linhagem dos cardiomiócitos. Além disso, as ALPL+ também expressam CD117, marcador de célula-tronco residente cardíaca (BEARZI, ROTA *et al.*, 2007), e ABCG2, um marcador de *side-population*, bem conhecido de células-tronco e células-tronco cardíacas (YAMAHARA, FUKUSHIMA *et al.*, 2008),. A expressão desses marcadores pode constituir uma característica adequada para avaliação, como ela pode ser benéfica para a diferenciação da linhagem cardíaca e para aplicações em terapia celular cardiovascular. Essas células podem ter várias vantagens sobre outros progenitores por causa de sua especificidade tecidual, comprometimento prévio para diferenciação e por ser autólogo, como sugerido para outras células progenitoras cardíacas (BOLLINI, SMART *et al.*, 2010). Ao realizar o ensaios de indução da diferenciação celular em cardiomiócitos, segundo o protocolo descrito por Smits (SMITS, VAN VLIET *et al.*, 2009), observou-se toxicidade e morte celular, e os dados quanto a expressão de marcadores de cardiomiócitos não foram avaliados. É provável que sejam necessárias adaptações no protocolo de cultivo para evitar a morte celular, tais como aumentar o número de células inicialmente plaqueadas ou mesmo avaliar a expressão de marcadores cardíacos num tempo mais precoce do que os 21 dias avaliados nos ensaios realizados neste estudo. Para o protocolo de indução de diferenciação em cardiomiócitos descrito por Galvez (GÁLVEZ, COVARELLO *et al.*, 2009), onde a expressão de marcadores foi avaliada após 5 dias da indução, se observou aumento da percentagem de células que expresam GATA4. Este fator de transcrição é expresso de forma precoce no desenvolvimento embrionário do coração e participa na ativação da expressão de outros genes importantes para a diferenciação cardíaca, participando também de hipertrofia de miócitos cardíacos em adultos (PIKKARAINEN, TOKOLA *et al.*, 2004). A identificação de marcação nuclear, indica que GATA4 pode estar atuando na

regulação de outros genes como NKX2.5, MEF2C, GATA6 entre outros, embora não detectados nos ensaios realizados para os 5 dias de indução avaliados.

Através deste estudo, foi possível isolar células cardíacas humanas com características de células-tronco mesenquimais a partir de tecidos provenientes de banco de tecido. Essas células mostraram também expressão de marcadores cardíacos e aumento da expressão de GATA4 quando induzidas a diferenciação em cardiomiócitos. Desta forma, os dados obtidos com esse projeto indicam que é possível obter células com potencial de diferenciação celular a partir de banco de tecidos. Desta forma, a criação de bancos de células provenientes de bancos de tecido podem oferecer esperança para a melhoria da qualidade de vida das pessoas que precisam de transplante de célula ou tecido. No futuro, os bancos de células alogênicas para reparação cardíaca devem ser avaliados, como proposto por Pasquinelli et al. (PASQUINELLI, TAZZARI *et al.*, 2007). Este trabalho apresenta uma nova visão sobre as possíveis fontes e estratégias para a obtenção e células e torná-las disponíveis para a terapia celular.

7 CONCLUSÕES

Com o presente projeto foi possível estabelecer um protocolo de isolamento e cultivo de células cardíacas humanas pelo método de cultura de explante de amostras de tecido cardíaco proveniente de um banco de tecidos. A partir dessa população celular heterogênea, foi possível isolar células ALPL+, que foram caracterizadas e expandidas em cultura e apresentaram características de células-tronco mesenquimais. Estas ainda expressavam constitutivamente marcadores cardíacos e sob indução da diferenciação em cardiomiócitos, ainda sofreram aumento da expressão de GATA4, com localização nuclear. Foi o primeiro relato deste tipo de abordagem na literatura, o que pode trazer benefícios para os avanços na obtenção de fontes alternativas de células para terapia celular.

8 PERSPECTIVAS

As perspectivas deste trabalho incluem continuar o estudo das células cardíacas humanas no contexto da diferenciação em linhagens cardíacas. Algumas abordagens, como o uso de modelos de cultura em três dimensões, o uso de meio condicionado de tecido cardíaco ou mesmo combinações de fatores solúveis e elementos de matriz extracelular podem favorecer a diferenciação em linhagens celulares com a finalidade de utilização em terapias celulares. Contudo, para tal é necessário o estabelecimento de modelos de estudo de diferenciação celular que possam ser utilizados como controles positivos de diferenciação em cardiomiócitos. Por exemplo, pode-se buscar purificar populações positivas para marcadores de progenitores cardíacos como o CD117 ou o SCA1 com uso de citometria de fluxo ou mesmo utilizar linhagens de células-tronco embrionárias, ou células-tronco induzidas. Outra abordagem seria analisar a expressão de outros marcadores de células-tronco mesenquimais como 3G5, que marcam pericitos, ou mesmo avaliar se existem subpopulações como ALPL+/CD117+, ALPL+/SCA1+, ALPL+/3G5+, etc, assim como avaliar o efeito destes fenótipos na capacidade de diferenciação em cardiomiócitos.

Outras perspectivas deste projeto incluem a realização de ensaios pré-clínicos da infusão de células cardíacas isoladas, cultivadas, induzidas à diferenciação em cardiomiócitos e/ou associados a células endoteliais em modelos de ratos infartados com a finalidade de observar o efeito funcional destas células no modelo *in vivo*.

Apesar de não se ter observado a presença de células endoteliais na população de células cardíacas humanas, seu isolamento a partir de tecido cardíaco proveniente de banco de tecidos é factível. Desta forma, novos protocolos podem ser estabelecidos para isolar células endoteliais cardíacas e avaliar seu papel em ensaios pré-clínicos, em comparação com o uso de linhagens de células endoteliais comerciais ou estabelecidas em laboratórios colaboradores.

Outra questão a ser avaliada é que a presença da enzima fosfatase alcalina em células cardíacas humanas em populações celulares enriquecidas para este marcador, parece indicar um potencial de diferenciação celular em adipócitos,

osteoblastos e condrócitos maior que em comparação com as células totais derivadas de tecido cardíaco. Desta forma, seria interessante avaliar se células-tronco mesenquimais de outras fontes, quando enriquecidas para a fosfatase alcalina, também apresentam o mesmo comportamento. Uma vez avaliado o perfil biológico do efeito da presença ou ausência da enzima fosfatase alcalina, buscar identificar os mecanismos gerais que favorecem a diferenciação celular destas células através de análises de expressão gênica ou proteômica em larga escala.

Além do papel das células cardíacas humanas como fonte de células para terapia celular, estas células podem ser avaliadas como fonte de fatores solúveis que possam ter efeito parácrino, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*, que possam auxiliar na regeneração tecidual. Estes temas podem ser abordados através da análise da expressão gênica ou análise proteômica das células cardíacas humanas. Estas células secretam VEGF e TGF β , por exemplo e desta forma sua atividade biológica *in vitro* deve ser estabelecida.

Desta forma, este projeto permitiu o estabelecimento de uma nova linha de pesquisa, com grandes perspectivas de continuidade e também de integração com outras linhas de pesquisa em andamento em nossa equipe, como a pesquisa de fatores solúveis e elementos de matriz extracelular. Além disso, busca-se também a elucidação de mecanismos de diferenciação celular por técnicas de análise da expressão gênica em larga escala, incluindo sequenciamento de última geração e análise proteômica.

REFERÊNCIAS

- ADEWUMI, O. et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. **Nature Biotechnology**, Basingstoke, v. 25, n. 7, p. 803-16, 2007.
- BALBINOTTO NETO, G.; SILVA, E. N. The costs of cardiovascular disease in Brazil: a brief economic comment. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 4, p. 198-9, 217-8, 2008.
- BALLARD, V.; EDELBERG, J. Stem cells for cardiovascular repair - the challenges of the aging heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, Manchester, v. 45, n. 4, p. 582-92, 2008.
- BARILE, L. et al. Endogenous cardiac stem cells. **Progress in Cardiovascular Diseases**, New York, v. 50, n. 1, p. 31-48, 2007.
- BATTULA, V. et al. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. **Haematologica**, Stanford, v. 94, n. 2, p. 173-84, 2009.
- BEARZI, C. et al. Human cardiac stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 35, p. 14068-73, 2007.
- BELTRAMI, A. et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. **Cell**, Cambridge, v. 114, n. 6, p. 763-76, 2003.
- BELTRAMI, A. et al. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). **Blood**, Washington, v. 110, n. 9, p. 3438-46, 2007.
- BELTRAMI, A. et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 344, n. 23, p. 1750-7, 2001.

BERGERS, G.; SONG, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. **Neuro Oncology**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 452-64, 2005. Disponível em:

BIANCO, P. Back to the future: moving beyond "mesenchymal stem cells". **Journal of Cellular Biochemistry**, Malden, v. 112, n. 7, p. 1713-21, 2011..

BOLLINI, S.; SMART, N.; RILEY, P. Resident cardiac progenitor cells: At the heart of regeneration. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, Manchester, 2010.

BRACHVOGEL, B. et al. Perivascular cells expressing annexin A5 define a novel mesenchymal stem cell-like population with the capacity to differentiate into multiple mesenchymal lineages. **Development**, Cambridge, v. 132, n. 11, p. 2657-68, 2005.

CHAMBERLAIN, G. et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, Malden, v. 25, n. 11, p. 2739-49, 2007.

CHEN, Z. et al. Gap junction protein connexin 43 serves as a negative marker for a stem cell-containing population of human limbal epithelial cells. **Stem Cells**, Malden, v. 24, n. 5, p. 1265-73, 2006.

COVAS, D. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. **Experimental Hematology**, New York, v. 36, n. 5, p. 642-54, 2008.

CRISAN, M. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 3, n. 3, p. 301-13, 2008.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A.; NARDI, N. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, Malden, v. 26, n. 9, p. 2287-99, Sep 2008. ISSN 1549-4918.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.; NARDI, N. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 119, n. Pt 11, p. 2204-13, 2006.

DELLAVALLE, A. et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. **Nature Cell Biology**, London, v. 9, n. 3, p. 255-67, 2007.

DELLAVALLE, A. et al. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. **Nature Communications**, Basingstoke, v. 2, p. 499, 2011.

DI MEGLIO, F. et al. In vitro cultured progenitors and precursors of cardiac cell lineages from human normal and post-ischemic hearts. **European Journal of Histochemistry**, Pavia, v. 51, n. 4, p. 275-82, 2007.

DIAZ-FLORES, L. et al. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, n. 275, p. 280-6, 1992.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, Greenville, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

EGGINTON, S. et al. In vivo pericyte-endothelial cell interaction during angiogenesis in adult cardiac and skeletal muscle. **Microvascular Research**, v. 51, n. 2, p. 213-28, 1996.

ETCHEVERS, H. et al. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. **Development**, Cambridge, v. 128, n. 7, p. 1059-68, 2001.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, Basingstoke, v. 292, n. 5819, p. 154-6, 1981..

FINE, G. C.; LIAO, R.; SOHN, R. L. Cell therapy for cardiac repair. **Panminerva Medica**, v. 50, n. 2, p. 129-37, 2008.

FORMIGA, F. et al. Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model. **Journal of Controlled Release**, v. 147, n. 1, p. 30-7, 2010.

FRAGA, A. M. et al. Establishment of a Brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. **Cell Transplantation**, Tampa, v. 20, n. 3, p. 431-40, 2011.

GALVEZ, B. et al. Cardiac mesoangioblasts are committed, self-renewable progenitors, associated with small vessels of juvenile mouse ventricle. **Cell Death and Differentiation**, Rome, v. 15, n. 9, p. 1417-28, 2008.

GERHARDT, H.; BETSHOLTZ, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 314, n. 1, p. 15-23, 2003.

GIMBLE, J.; GUILAK, F. Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 58, p. 137-60, 2003.

GONZALES, C.; PEDRAZZINI, T. Progenitor cell therapy for heart disease. **Experimental Cell Research**, v. 315, n. 18, p. 3077-85, 2009.

GÁLVEZ, B. et al. Human cardiac mesoangioblasts isolated from hypertrophic cardiomyopathies are greatly reduced in proliferation and differentiation potency. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 83, n. 4, p. 707-16, 2009.

HENG, B. et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 34-42, 2004.

HIERLIHY, A. et al. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 530, n. 1-3, p. 239-43, 2002.

HIRSCHI, K.; D'AMORE, P. Pericytes in the microvasculature. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 687-98, 1996.

HOWSON, K. M. et al. The postnatal rat aorta contains pericyte progenitor cells that form spheroidal colonies in suspension culture. **The American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 289, n. 6, p. C1396-407, 2005.

KEIRSTEAD, H. S. et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. **The Journal of Neuroscience**, Washington, v. 25, n. 19, p. 4694-705, 2005.

KESSLER, P. D.; BYRNE, B. J. Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. **Annual Reviews of Physiology**, Palo Alto, v. 61, p. 219-42, 1999.

KIM, E. J. et al. Angiogenesis by endothelial cell transplantation. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, Stanford, v. 122, n. 5, p. 963-71, 2001.

.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Basingstoke, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LAMAGNA, C.; BERGERS, G. The bone marrow constitutes a reservoir of pericyte progenitors. **The Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 4, p. 677-81, 2006.

LANGER, D. et al. The ectonucleotidases alkaline phosphatase and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 are associated with subsets of progenitor cell populations in the mouse embryonic, postnatal and adult neurogenic zones. **Neuroscience**, v. 150, n. 4, p. 863-79, 2007.

LI, R. K. et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. **The Annals of Thoracic Surgery**, Stanford, v. 62, n. 3, p. 654-60; discussion 660-1, 1996.

LINDNER, H. et al. Loss of myocardial capillary endothelial-cell alkaline phosphatase (ALP) activity in primary endothelial cell culture. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 291, n. 3, p. 497-505, Mar 1998. ISSN 0302-766X.

MAJESKY, M. W. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Greenville, v. 27, n. 6, p. 1248-58, 2007.

MAKINO, S. et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 103, n. 5, p. 697-705, Mar 1999. ISSN 0021-9738.

MESSINA, E. et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. **Circulation Research**, Greenville, v. 95, n. 9, p. 911-21, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, R. I. D. I. P. A. S.-R. Indicadores e Dados Básicos, IDB-2009. Brasil, 2009. Disponível em: <
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ibd2009/matriz.htm#mort> >. Acesso em: 06/10/2011.

MURRY, C. E. et al. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 98, n. 11, p. 2512-23, 1996. I

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Stem cells: scientific progress and future research directions**. 222 p. 2001. Disponível em: <
<http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/fullrptstem.pdf> >. Acesso em outubro de 2011.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Regenerative Medicine**. 2006. 106 p. Disponível em: <
http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative_Medicine_2006.pdf >. Acesso em outubro de 2011.

O'CONNOR, M. et al. Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. **Stem Cells**, Malden, v. 26, n. 5, p. 1109-16, 2008.

ORLIC, D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, Basingstoke, v. 410, n. 6829, p. 701-5, 2001.

PASQUINELLI, G. et al. Thoracic aortas from multiorgan donors are suitable for obtaining resident angiogenic mesenchymal stromal cells. **Stem Cells**, Malden, v. 25, n. 7, p. 1627-34, 2007.

PIKKARAINEN, S. et al. GATA transcription factors in the developing and adult heart. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 196-207, 2004.

PITTENGER, M. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, Cambridge, v. 284, n. 5411, p. 143-7, 1999.

POULY, J. et al. Cardiac stem cells in the real world. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, Stanford, v. 135, n. 3, p. 673-8, 2008.

REBELATTO, C. et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, London, v. 233, n. 7, p. 901-13, 2008.

REBELATTO, C. et al. Expression of cardiac function genes in adult stem cells is increased by treatment with nitric oxide agents. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 378, n. 3, p. 456-61, 2009.

RIEKSTINA, U. et al. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. **Stem Cells Reviews and Reports**, v. 5, n. 4, p. 378-86, 2009.

ROGERS, I.; CASPER, R. Umbilical cord blood stem cells. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, New York, v. 18, n. 6, p. 893-908, 2004.

ROMANOV, Y.; SVINTSITSKAYA, V.; SMIRNOV, V. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem Cells**, Malden, v. 21, n. 1, p. 105-10, 2003.

SARUGASER, R. et al. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. **Stem Cells**, Malden, v. 23, n. 2, p. 220-9, 2005.

SCHITTINI, A. et al. Human cardiac explant-conditioned medium: soluble factors and cardiomyogenic effect on mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, London, v. 235, n. 8, p. 1015-24, 2010. ISSN 1535-3699.

SCHWAB, K.; GARGETT, C. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. **Human Reproduction**, Oxford, v. 22, n. 11, p. 2903-11, 2007. >.

SCORSIN, M. et al. Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium? **Circulation**, Greenville, v. 96, n. 9 Suppl, p. II-188-93, 1997.

SENEGAGLIA, A. C. et al. Are purified or expanded cord blood-derived CD133+ cells better at improving cardiac function? **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, London, v. 235, n. 1, p. 119-29, 2010.

SHAKE, J. et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. **The Annals of Thoracic Surgery**, Stanford, v. 73, n. 6, p. 1919-25; discussion 1926, 2002. >.

SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. [Journal of Bone and Mineral Research](#), Washington, v. 18, n. 4, p. 696-704, 2003.

SHIGUNOV, P. et al. PUMILIO-2 Is Involved in the Positive Regulation of Cellular Proliferation in Human Adipose-Derived Stem Cells. **Stem Cells and Development**, New Rochelle, 2011.

SIMS, D. Diversity within pericytes. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Malden, v. 27, n. 10, p. 842-6, Oct 2000. ISSN 0305-1870.

SMITS, A. et al. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology. **Nature Protocols**, v. 4, n. 2, p. 232-43, 2009..

SOBIESIAK, M. et al. The Mesenchymal Stem Cell Antigen MSCA-1 is Identical to Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase. **Stem Cells and Development**, New Rochelle, 2009.

SOUZA, L. et al. Combined transplantation of skeletal myoblasts and mesenchymal cells (cocultivation) in ventricular dysfunction after myocardial infarction. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 4, p. 294-9; 288-93, 2004.

STADTFELD, M.; HOCHEDLINGER, K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. **Genes & Development**, New York, v. 24, n. 20, p. 2239-63, 2010.

STRAUER, B. et al. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. **Journal of the American College of Cardiology**, San Diego, v. 46, n. 9, p. 1651-8, Nov 2005.

SUNDBERG, C. et al. Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring. **Laboratory Investigation**, v. 74, n. 2, p. 452-66, 1996.

SUS, M. D. S. D.-D. D. I. D. Relatórios Estatísticos. 2011. Disponível em: < <http://189.28.128.37/portal/public/transplantes/destaque/dest9> >. Acesso em: 17 de outubro de 2011.

TAKAHASHI, K. et al. Modulated inflammation by injection of high-mobility group box 1 recovers post-infarction chronically failing heart. **Circulation**, Greenville, v. 118, n. 14 Suppl, p. S106-14, 2008.

Takahashi, K et al. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. **Nature Protocols**, v. 2, n. 12, p. 3081-9, 2007.

THOMAS, W. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. **Brain Research Reviews**, New York, v. 31, n. 1, p. 42-57, 1999.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, Cambridge, v. 282, n. 5391, p. 1145-7, 1998.

TOMA, C. et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. **Circulation**, Greenville, v. 105, n. 1, p. 93-8, 2002.

TOMITA, S. et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. **Circulation**, Greenville, v. 100, n. 19 Suppl, p. II247-56, 1999.

TOMITA, Y. et al. Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: current status and problems to be solved. **Medical and Biological Engineering Computing**, v. 45, n. 2, p. 209-20, 2007.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4, 1979.

WANG, J. S. et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, Stanford, v. 120, n. 5, p. 999-1005, 2000.

WONG, R. S. Mesenchymal stem cells: angels or demons? **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cairo, v. 2011, p. 459510, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention of cardiovascular disease : guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk**. Geneva: World Health Organization, 2007a. vi, 86 p. Disponível em: < http://www.who.int/cardiovascular_diseases/guidelines/PocketGL.ENGLISH.AFR-D-E.rev1.pdf >. Acesso em outubro de 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention of cardiovascular disease : pocket guidelines for assessment and management of cardiovascular risk : (WHO/ISH cardiovascular risk prediction charts for the African Region)**. Geneva: World Health Organization, 2007b. 30 p. ISBN 9789241547260. Disponível em: < http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241547260_eng.pdf >. Acesso em outubro de 2011.

YAMAHARA, K. et al. Heterogeneous nature of adult cardiac side population cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 371, n. 4, p. 615-20, 2008.

YOON, B. et al. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment. **Differentiation**, Helsinki, v. 74, n. 4, p. 149-59, 2006.

ZANNETTINO, A. C. et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. **Journal of Cellular Physiology**, Helsinki, v. 214, n. 2, p. 413-21, 2008.

ZUK, P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-95, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A	Lista de iniciadores	87
APÊNDICE B	Lista de anticorpos	89
APÊNDICE C	Dados dos doadores	91
APÊNDICE D	Preparo de soluções	92

APÊNDICE A – LISTA DE INICIADORES

Sigla oficial	Nome completo do gene tal qual descrito no NCBI	Sequência (5' - 3')	ID do gene no NCBI	Tamanho do produto (bp)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	+: TGGCCCCCATGCTGAGTGACAC -: TGGCGCAGGGGCACAGCAGAC	249	160	55	(Rebelatto, Aguiar <i>et al.</i> , 2008) 2
FABP4	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	+: ATGGGATGGAAAATCAACCA -: GTGGAAGTGACGCCTTTCAT	2167	97	60	
CD44	CD44 molecule	+: CCCTCTTGGCCTTGGCTTTGATTC -: TTGAGTCCACTTGGCTTTCTGTCC	960	133	55	
ACTA2	Alfa smooth muscle actin	+: CCGGGACATCAAGGAGAACTG -: GGTACATAGTGGTGCCCCCTGATA	59	277	55	(Chen, Evans <i>et al.</i> , 2006)
TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	+: CGTGCGGCAGCTGTACATTGACTT -: CGCCCGGGTTATGCTGGTTGT	7040	200	55	
CAD11a	Cadherin 11	+: TCACACTGACCTCGACAGATTTTT -: AGGGGGTAGGCTGAAGATAA	1009	331	55	
FSP1	Fibroblast-specific protein-1	+: TCGGGCAAAGAGGGTGACAAGTT -: ATGGCGATGCAGGACAGGAAGAC	6275	205	55	(Rebelatto, Aguiar <i>et al.</i> , 2008) (Yoon, Yoo <i>et al.</i> , 2006)
ABCG2	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 2	+: ACCATTGCATCTTGGCTGTC -: CGATGCCCTGCTTTACCAAA	9429	233	55	
Col1a	Collagen, type I, alpha 1	+: GGCCATCCAGCTGACCTTCC -: CGTGCAGCCATCGACAGTGAC	1277	205	60	
Col 2	Collagen, type II, alpha 1	+: CCGGGCAGAGGGCAATAGCAGGTT -: CAATGATGGGGAGGCGTGAG	1280	128	60	(Yoon, Yoo <i>et al.</i> , 2006)
GATA4	GATA-binding protein 4	+: CTCCCCTGGCAAAACAAGAG -: TGCCGTGTCTTAGCAGTCGT	2626	422	62	

CD117	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (CD117)	+: CATAATGAAGACTTGCTGGGATGC -: CACGGGCTTCTGTCTGGTTGG	3815	148	55	
TNNT2	Troponin T type 2 (cardiac)	+: AGGAGAAGTTCAAGCAGCAGA -: GCGAGCGAGGAGCAGAT	7139	155	55	(Schittini, Celedon <i>et al.</i> , 2010)
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	+: CTACCTCCACCATGCCAAGTG -: TGCGCTGATAGACATCCATGA	7422	101	60	(Schittini, Celedon <i>et al.</i> , 2010)
GAPDH	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	+: GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC -: TGGTTCACACCCATGACGA	2597	150	60	(Rebelatto, Aguiar <i>et al.</i> , 2008)
RNApol IIa	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A	+: TACCACGTCATCTCCTTTGATGGCT -: GTGCGGCTGCTTCCATAA	5430	187	60	

APÊNDICE B – LISTA DE ANTICORPOS

Sigla oficial(a)	Nome completo do gene tal qual descrito no NCBI	ID do gene no NCBI	Isotipo	Apresentação	Fabricante	Catálogo	Diluição
GATA6	GATA binding protein 6	2627	Policlonal de coelho, IgG	Purificado	Santa Cruz	SC9055	1:50
GATA4	GATA binding protein 4	2626	Policlonal de coelho, IgG	Purificado	Santa Cruz	SC9053	1:50
NKX2.5	NK2 homeobox 5	1482	Monoclonal de camundongo, IgG	Purificado	Santa Cruz	SC365307	1:50
MEF2C	myocyte enhancer factor 2C	4208	Policlonal de cabra, IgG	Purificado	Santa Cruz	SC13268	1:50
THY1 (CD90)	Thy-1 cell surface antigen	7070	Monoclonal de camundongo, IgG	FITC	E-Bioscience	11-0909-73	1:20
THY1 (CD90)	Thy-1 cell surface antigen	7070	Monoclonal de camundongo, IgG	APC	E-Bioscience	17-0909-73	1:100
ITGAM (CD11b)	integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)	3684	Monoclonal de camundongo, IgG	PE	E-Bioscience	12-0112-82	1:100
CD19	CD19 molecule	930	Monoclonal de camundongo, IgG	FITC	E-Bioscience	11-0199-73	1:100
HLADRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	3122	Monoclonal de camundongo, IgG	APC	E-Bioscience	17-9956-42	1:100
PDGFRB (CD140b)	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	5159	Monoclonal de camundongo, IgG	PE	Becton Dickinson	558821	1:100
CD34	CD34 molecule	947	Monoclonal de camundongo, IgG	PE	Becton Dickinson	54295	1:100
PECAM1 (CD31)	platelet/endothelial cell adhesion molecule	5175	Monoclonal de camundongo, IgG	FITC	E-Bioscience	11-0319-42	1:100
Ly6a (SCA1)	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	110454	Monoclonal de camundongo, IgG	PE	Miltenyi Biotec	130-093-224	1:20
CD117	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral	3815	Monoclonal de camundongo, IgG	PE	E-Bioscience	12-1179-73	1:5

MCAM (CD146)	melanoma cell adhesion molecule	4162	Monoclonal de camundongo, IgG	PE	Becton Dickinson	550315	1:20
ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	249	Monoclonal de camundongo, IgG	PE	RD Systems	FAB1448P	1:10
ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	249	Monoclonal de camundongo, IgG	APC	RD Systems	FAB1448A	1:10
NCAM1 (CD56)	neural cell adhesion molecule 1	4684	Monoclonal de camundongo, IgG	PE-Cy7	Becton Dickinson	557747	1:5
NT5E (CD73)	5'-nucleotidase, ecto (CD73)	4907	Monoclonal de camundongo, IgG	APC	E-Bioscience	17-0739-42	1:100
ENG (CD105)	endoglin	2022	Monoclonal de camundongo, IgG	PE	E-Bioscience	E029168	1:100

^a Nome mais usual, quando aplicável.

Isotiocinato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina-P (PE), alofococianina (APC), ficoeritrina-P/cianina 7 (PE-Cy7).

APÊNDICE C - DADOS DOS DOADORES E TAXA DE SUCESSO NO ISOLAMENTO CELULAR

No. do Doador	Sexo	Idade	Causa Mortis	Tempo total de Isquemia (horas)	Aurícula	Ventrículo	
					Explante	Explante	Dissociação Enzimática
1	M	21	Traumatismo crânio encefálico – Ferimento arma de fogo	18,3	ND	SIM	SIM
2	F	43	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico	12,3	ND	SIM	SIM
3	M	57	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico	31,6	ND	NÃO	NÃO
4	M	34	Traumatismo crânio encefálico –G	33,4	ND	SIM	NÃO
5	F	54	Rotura Aneurisma	17,0	SIM	SIM	ND
6	M	41	Traumatismo crânio encefálico – Ferimento arma de fogo	26,8	SIM	NÃO	NÃO
7	F	55	Acidente Vascular Cerebral – Hemorrágico	30,5	SIM	NÃO	SIM
8	M	46	Acidente Vascular Cerebral – Hemorrágico	3,0	SIM	NÃO	ND
9	F	53	Rotura Aneurisma	ND	NÃO	NÃO	ND
10	M	54	Acidente Vascular Cerebral – Hemorrágico	2,5	NÃO	NÃO	ND
11	F	52	Hemorragia Subaracnoidea	15,9	NÃO	NÃO	ND
12	M	21	Ferimento arma de fogo – CRANIO	30,3	SIM	SIM	ND
16	M	25	Ferimento arma de fogo em tórax e abdômen	10,8	NÃO	NÃO	ND
17	F	22	Rotura de aneurisma cerebral - hemorragia subaracnoidea	15,9	SIM	NÃO	ND
18	M	36	Traumatismo crânio encefálico - queda de cavalo	30,7	SIM	SIM	ND
19	M	38	Traumatismo crânio encefálico - Queda da própria altura	20,0	SIM	NÃO	ND
20	F	41	Acidente Vascular Cerebral – Hemorrágico	18,4	SIM	NÃO	ND
21	F	34	Traumatismo crânio encefálico - Ferimento arma de fogo	21,6	SIM	SIM	ND
22	F	34	Traumatismo crânio encefálico + politrauma	34,9	NÃO	NÃO	ND
23	M	35	Traumatismo crânio encefálico	8,3	SIM	NÃO	ND
24	M	34	Traumatismo crânio encefálico	13,6	SIM	NÃO	ND

SIM: Sucesso no isolamento celular. Não: Insucesso no isolamento celular.

Sexo dos doadores é indicado por M (masculino) e F (feminino). ND Não determinado.

APÊNDICE D

PREPARO DE MATERIAIS, SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

Soluções Salinas Balanceadas**Solução A (estoque 20x)**

NaCl 160g

KCl 8g

Na₂HPO₄.12H₂O 5,84g

KH₂PO₄ 3,0g

Água ultrapura qsp 1000 mL

Esterilizado por autoclavação 121°C por 15 minutos

Estocar 2 a 8°C

Solução B (estoque 20x)

CaCl₂.2H₂O 0,16g

MgSO₄.7H₂O 3,9g

H₂O deionizada q.s.p. 500,0mL

Estocar a 4°C. Esta solução pode ser esterilizada por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

Solução C (estoque 20x)

Glicose 22 g

Água ultrapura qsp 1000 mL

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Estocar 2 a 8°C

Solução D (estoque 500x)

Vermelho de Fenol 1g

H₂O deionizada q.s.p. 100,0mL

Solubilizar em água alcalinizada com NaOH 1N e completar o volume.

Estocar a 4°C.

Solução E (estoque 20x)

Na_2SO_4 2g

Água ultrapura qsp 1000 mL

Esterilizado por autoclavação 121°C por 15 minutos

Estocar 2 a 8°C

Solução Salina Balanceada (BSS)

Solução A 50 mL

Solução B 50 mL

Solução C 50 mL

Solução D 0,85 mL

Água ultrapura qsp 1000 mL

Ajustar pH 7,0 - 7,5 com fita indicadora de pH

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Aliquotar em frascos de 1000 mL

Estocar 2 a 8°C

Solução Salina Balanceada sem cálcio e magnésio (BSS.CMF)

Solução A 50 mL

Solução C 50 mL

Solução E 50 mL

Solução D 0,85 mL

Água ultrapura qsp 1000 mL

Ajustar pH 7,0 - 7,5 com fita indicadora de pH

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Aliquotar em frascos de 1000 mL

Estocar 2 a 8°C

Solução Salina Balanceada sem cálcio e magnésio (BSS.CMF) sem vermelho de fenol

Solução A 50 mL

Solução C 50 mL

Solução E 50 mL

Água ultrapura qsp 1000 mL

Ajustar pH 7,0 - 7,5 com fita indicadora de pH

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Aliquotar em frascos de 1000 mL

Estocar 2 a 8°C

Tripsina 0,05%/EDTA 0,02%

Solução A 50 mL

Solução C 50 mL

Solução E 50 mL

Solução D 0,85 mL

EDTA 0,2 g

Tripsina 0,5 g

Água ultrapura qsp 1000 mL

Ajustar pH 7,0 -7,5 com fita indicadora de pH

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Aliquotar 40mL por tubo e estocar a -20°C.

PS 100 x

Penicilina G Potássica 1,2 g

Sulfato de Estreptomicina 2,0g

Água ultrapura qsp 200 mL

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Aliquotar 5 a 10 mL por tubo e estocar a -20°C.

Meio F12

Meio F12 Gibco 21700-026 1 envelope com 10,6 g

Bicarbonato de Sódio 1,176g

Água ultrapura qsp 1000 mL

Ajustar pH para 7 – 7,5

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Estocar a 2 a 8°C.

Meio de cultura Megacell suplementado

Soro Fetal bovino 25 mL

Solução de aminoácidos não essenciais 5 mL

Solução de PS 100x 5 mL

Solução de L-Glutamina 200 mL 5 mL

Solução de FGF-b 5 µg/mL 100 µL

Solução de Betamercaptoetanol 0,1M 500 µL

Meio base Mega Cell, qsp 500 mL

Meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol

Meio base DMEM sigma D5030 1 frasco

Solução C 50 mL

Ajustar pH 7 – 7,5

Água ultrapura qsp 1000 mL

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Estocar a 2 a 8°C.

Betamercaptoetanol 0,1M 1000x

Betamercaptoetanol 14,1 M 1mL

Água ultrapura 140 mL.

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Estocar a 2 a 8 °C.

L-glutamina 200 mM

L-glutamina, Gibco 1131404

29,23 g

Água ultrapura qsp 1000 mL

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Aliquotar 5 a 10 mL por tubo e estocar a -20°C.

FGF-B 25 µg/mL

FGF-b, fator de crescimento de fibroblasto básico, humano, recombinante, Sigma F0291

25 microgramas ressuspensas em 1 mL de MegaCell

Aliquotar 100 microlitros por tubo

Estocar a -20°C.

Anticorpo anti-fosfatase Alcalina Biotinilado

Anticorpo anti-fosfatase alcalina RD Systems BAM1448 100 microgramas

PBS Estéril 1 mL

Ressuspender o anticorpo liofilizado em 1 mL de PBS estéril, aliquotar 10 microlitros por cada microtubo.

Estocar – 20°C.

5- azacitidina 500 mM (100x)

5-azacitidina Sigma A1287, 1 frasco ressuspender em 10 mL de meio de cultura DMEM estéril

Preparar no gelo, ao abrigo da luz.

Aliquotar em volumes de 450, 200 e 100 microlitros. Estocar -20°C.

Descongelar no momento do uso e manipular ao abrigo da luz. Não recongelar.

Solução Ácido Ascorbico 10^{-1} M 100x

Ácido Ascorbico sigma A4403, liofilizado, estéril, 100 mg

Água ultrapura estéril 5,7 mL

Aliquotar 45 e 200 microlitros.

Estocar -20°C.

Descongelar no momento do uso. Não recongelar.

EDTA 200 mM

EDTA.2H₂O Sigma E5134 7,44g

NaOH 1 a 3 lentilhas

Água ultrapura qsp 100 mL

Solubilizar em água as lentilhas de NaOH sob agitação. Adicionar o EDTA.

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Estocar a 2 a 8°C.

CaCl₂ 100mM

CaCl₂ Sigma C3306 1,47 g

Água ultrapura qsp 100 mL

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Estocar a 2 a 8°C.

MgCl₂ 400mM

MgCl₂ Sigma M8266 3,8084 g

Água ultrapura qsp 100 mL

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Estocar a 2 a 8°C.

BSA 5% 50X

BSA Sigma A4503 2g

Água ultrapura qsp 40 mL

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 micrometros

Aliquotar 5 a 10 mL por tubo e estocar a -20°C.

Tampão 1

BSA 5% 2 mL

BSS.CMF sem vermelho de fenol qsp 100 mL

Ajustar pH 7 – 7,5

Estocar a 2 a 8°C.

Tampão 2

BSA 5% 2 mL

EDTA 200 mM 1 mL

BSS.CMF sem vermelho de fenol qsp 100 mL

Ajustar pH 7 – 7,5

Estocar a 2 a 8°C.

Tampão 3

MgCl₂ 400 mM 0,2 mL

CaCl₂ 100 mM 0,2 mL

Soro fetal Bovino 0,2 mL

Solução de Penicilina e estreptomicina 0,2 mL

L-Glutamina 200 mM 0,2 mL

Meio de cultura Megacell qsp 20 mL

Estocar a 2 a 8 °C.

Solução de Paraformaldeído 4%

Paraformaldeído 20g

Solução NaOH 1M 5 mL

Solução de PBS 10x

Água ultrapura qsp 500 mL

Aquecer 200 mL de água ultrapura em um Becker de vidro até 65 °C.

Em capela química de exaustão, adicionar 20 gramas de paraformaldeído sob agitação.

Adicionar 5 mL de solução de NaOH 1M, lentamente até que a solução fique transparente. Deixar dissolver completamente sob agitação.

Deixar resfriar a temperatura ambiente.

Adicionar 50 mL de solução de PBS 10x.

Ajustar pH para 7 – 7,5, sob agitação.

Completar até 500 mL com água ultrapura.

Caso haja precipitado, filtrar em papel de filtro.

Aliquotar em 5 e 10 mL e estocar a -20°C.

Solução pra preparo de filme de Colágeno

Solução estoque de colágeno de calda de rato Sigma, C3867 1 mL

Água ultrapura estéril aquecida a 37°C 19 mL

Homogeneizar a solução.

Estocar a 2 – 8 °C.

ANEXOS

ANEXO A	Aprovação do comitê de ética em pesquisa	105
ANEXO B	Artigo publicado, tema principal da tese	110
ANEXO C	Financiamento obtido, tema principal da tese	121
ANEXO D	Artigo publicado, colaboradora	124
ANEXO E	Artigo publicado, colaboradora	126
ANEXO F	Artigo publicado, colaboradora	128

ANEXO A



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 20 de dezembro de 2007.

Carta: 108/07

De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dr. Samuel Goldenberg e
- Dra. Andréa Rodrigues Ávila

Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **419/07** intitulado **"Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais adultas: aplicação em terapias celulares do sistema cardiovascular"** que está com **APROVADO**.

Atenciosamente


DAS NETI
Unidade Geral
Ministério da Saúde em Pesquisa
Fundação Oswaldo Cruz

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais adultas: aplicação em terapias celulares do sistema cardiovascular.

Pesquisador Responsável Samuel Goldenberg

Data da Versão

Cadastro 419/07

Data do Parecer 10/12/2007

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

Estudo básico dos mecanismos celulares e moleculares do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais adultas obtidas de diferentes origens visando a utilização em cardiomioplastia.

Sumário do Projeto

Trata-se de um estudo multidisciplinar que envolve a participação de diferentes instituições para investigar os mecanismos celulares e moleculares do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais adultas obtidas de diferentes origens visando a utilização em cardiomioplastia. O projeto é original e de grande relevância.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Os objetivos estão claros e bem definidos.

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 270 Local 270
Cálculo do tamanho da amostra	Não necessário (pesquisa quali)
Participantes pertencentes a grupos especiais	Outros vínculos de dependência
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco-benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

O projeto de pesquisa completo prevê a inclusão de parturientes para a obtenção de sangue de cordão umbilical.

Cronograma	Adequado
------------	----------

Data de início prevista	Não especificado
Data de término prevista	Comentário
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Agência de fomento

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

O projeto será financiado pelo CNPq/ DECIT-MS. O cronograma está adequado.

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

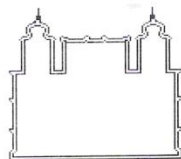
Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Após análise por este colegiado, das respostas às pendências no parecer emitido em 15/10/07, tendo por referência as normas e diretrizes da Resolução 196/96, foi decidido pela APROVAÇÃO do referido protocolo. Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais/anuais e relatório final do projeto de pesquisa. Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo original deverá ser submetida para apreciação do CEP/Fiocruz.

Marlene Braz

Marlene Braz
Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa
Em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 22 de agosto de 2011.

PARECER

Título do Projeto: "Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais adultas: aplicação em terapias celulares do sistema cardiovascular"

Protocolo CEP: 419/07

Pesquisador Responsável: Samuel Goldenberg

Instituição: ICC – Instituto Carlos Chagas/Fiocruz/PR

Foram apresentados e submetidos à apreciação do CEP/FIOCRUZ o relatório de atividades, adendo e documentos atualizados ao projeto original do projeto supra mencionado, ambos APROVADOS.

Patricia T. Bozza
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz

ANEXO B

Alkaline phosphatase-positive cells isolated from human hearts have mesenchymal stem cell characteristics

Alessandra Melo de Aguiar^{1*}, Crisciele Kuligovski¹, Marise Teresinha Brenner Affonso da Costa², Marco Augusto Stimamiglio¹, Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto³, Alexandra Cristina Senegaglia³, Paulo Roberto Slud Brofman³, Bruno Dallagiovanna¹, Samuel Goldenberg¹, Alejandro Correa¹

¹Carlos Chagas Institute, Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ, Curitiba, Brazil;

²Human Heart Valve Bank of Charity Hospital of the Brotherhood of Santa Casa de Misericórdia de Curitiba, Curitiba, Brazil;

³Core for Cell Technology, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

*Corresponding Author: ale_aguiar@tecpar.br

Received 3 September 2011; revised 30 September 2011; accepted 7 October 2011.

ABSTRACT

Tissue-specific resident cells have been identified as a promising population of progenitor cells for cell-based therapies. We describe here the isolation from adult human hearts of tissue nonspecific alkaline phosphatase-positive cells (ALPL+ cells) with mesenchymal stem cell (MSC) characteristics. Samples from 24 adult cadaveric donors were obtained from a valve bank. Mean total ischemia time was 21.5 ± 9.1 hours. The success rate for the isolation of human heart-derived cells by the explant culture technique was 70% for the right auricle (14 of 20 trials) and 33% for the right ventricle (7 of 21 trials). The total auricle-derived cell population (TAD) was used for the purification of ALPL+ cells. TAD and ALPL+ cells expressed markers for MSC and pericytes. TAD cells and ALPL+ cells differentiated into adipocytes, osteoblasts and chondroblasts, and ALPL+ cells expressed markers of these three lineages more strongly than TAD cells, as shown by RT-PCR. This population therefore has a greater potential for differentiation into mesenchymal lineages than TAD cells. Both cell populations express some markers of cardiac progenitors, such as GATA4, CD117 and VEGF. ALPL+ cells expressed troponin T and ABCG2, which are also markers of the cardiac lineage. Heart samples from tissue banks could be considered as sources of MSC with putative commitment towards cardiac lineages, even after prolonged ischemia times.

Keywords: Alkaline Phosphatase; Mesenchymal Stem Cell; Pericyte; Heart; Cell Differentiation

1. INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells (MSC) have been identified as a promising population of progenitor cells for cell-based therapies for the repair of mesenchymal tissue. Under appropriate conditions, they may give rise to various cell types with potential therapeutic applications, including osteoblasts, chondrocytes [1,2] and cardiomyocytes [3-5]. Several sources of MSC have been identified, including bone marrow [6], adipose tissue [7], umbilical cord blood [8] and heart tissue [9,10].

MSC are characterized by the conditions required for their culture, their capacity to differentiate and a panel of various immunophenotyping markers, many of which are also expressed by fibroblasts and other cell types [11]. Several proteins have been identified as markers of the MSC population, for use alone or in combination with other markers. These proteins include mesenchymal stem cell antigen-1 (MSCA-1) [12]. This marker has recently been shown to be identical to tissue nonspecific alkaline phosphatase [13].

Alkaline phosphatase is a dimeric enzyme catalyzing the hydrolysis of phosphomonoesters, resulting in the release of inorganic phosphate from biomolecules [14]. This enzyme is present in all organisms and in many human tissues. Four isoforms have been described in humans: intestinal, placental, germ cell, and tissue nonspecific alkaline phosphatase [14]. Tissue nonspecific alkaline phosphatase is a phosphatidylinositol-linked plasma membrane glycoprotein, which can therefore be used as a cell marker for immunophenotype characteriza-

tion and selection. This protein is a well known marker of embryonic stem cells (ESC) [15,16]. It is also a marker of neuron progenitor cells in mice [17]. Alkaline phosphatase-positive cells have also been identified as myogenic progenitor cells in human skeletal muscle, in which they were identified as pericytes [18]. Alkaline phosphatase has also been described as a perivascular marker present in MSC from the endometrium [19]. Indeed, the perivascular niche and the pericyte population have now been identified as possible MSC niches, as reviewed [20].

MSC can be isolated from the human heart, but it remains unclear whether the population of cells enriched in tissue nonspecific alkaline phosphatase has the same characteristics. In this study, we isolated and purified tissue nonspecific alkaline phosphatase-positive cells from heart tissue from cadaveric adult humans provided by a valve bank. We evaluated the characteristics of these cells as possible heart-derived MSC.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Collection of Human Cardiac Muscle Tissue

Human cardiac muscle tissue was obtained from the human heart valve bank of Charity Hospital of the Brotherhood of Santa Casa de Misericórdia de Curitiba, in accordance with the rules of the Oswaldo Cruz Foundation ethics committee (approval number 419/07). This investigation, carried out on human tissues, conformed to the principles outlined in the Helsinki Declaration. Tissue samples from the right auricle and/or right ventricle were collected from cadaveric donors were placed in F12 nutrient mixture supplemented with 2 mM L-glutamine (Gibco™ Invitrogen Corporation, USA), 100 IU/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin (Sigma, USA). Tissue samples were maintained at 4°C for no longer than 48 hours before processing.

2.2. Isolation and Culture of Human Heart-Derived Cells by Explant Culture

Human heart-derived cells were isolated by explant culture. In brief, heart tissues were rinsed in HBSS (Hanks balanced salt solution) and their mass was determined. We then used scalpels to dissect 500 to 900 mg of tissue into fragments 1 - 2 mm³ in size.

We cultured about 100 mg of tissue fragments in each 25 cm² culture flask (TPP, Switzerland). The tissue fragments adhered to the culture flasks coated with collagen film (Sigma, USA) after incubation at 37°C for one hour, in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide. We then added culture medium. The composition of

the maintenance medium was similar to that previously described [18], consisting of MegaCell™ DMEM (Sigma, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine (Gibco™ Invitrogen Corporation, USA), 5 ng/ml basic fibroblast growth factor, 0.1 mM β-mercaptoethanol, 1% non essential amino acids, 100 IU/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin (Sigma, USA).

The tissue fragments were cultured for 15 to 30 days, with the replacement of 50% of the medium weekly. After the cells had migrated from the explants, they were harvested by digestion with 0.025% trypsin (Gibco™ Invitrogen Corporation, USA) in 0.02% EDTA (Sigma, USA). Tissue fragments were separated from the cell suspension by passage through a cell strainer with a 40 μm mesh (BD Falcon™, USA). Cells were plated at a density of 0.2 - 0.5 × 10⁴ cells/cm². Cultured cells from passages 2 to 6 were used for all experiments.

2.3. Purification of Alkaline Phosphatase-Positive Cells

For the selection of tissue nonspecific alkaline phosphatase-positive cells (ALPL+), the total auricle-derived cell population (TAD) was incubated with a biotinylated antibody directed against the human tissue nonspecific alkaline phosphatase (R&D Systems, USA). ALPL+ cells were purified with the Collection™ anti mouse IgG kit (Invitrogen Dynal AS, Norway), in accordance with the manufacturer's instructions. Purified cells were cultured in maintenance medium and subjected to immunophenotyping, gene expression analysis and differentiation assays.

2.4. Immunophenotyping by Flow Cytometry

Flow cytometry data were acquired and analyzed as previously described [2]. Briefly, 2 × 10⁵ human heart-derived cells from passages 2 to 6 were labeled with antibodies against the following human proteins: CD90, CD14, HLA-DR, CD73 and CD140b (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) CD31, CD45, CD34 and CD133/1 (Miltenyi Biotec, Germany), CD105 and CD117 (E-bioscience, USA), tissue nonspecific alkaline phosphatase (R&D Systems, USA), and nestin (BD Pharmingen, USA). For intracellular staining, cells were permeabilized with Fix&Perm reagent (Caltag Laboratories, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. Mouse isotype IgG1 antibodies were used as controls (BD PHARMINGEN™, USA). About 10,000 labeled cells were acquired with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA) and analyzed with FlowJo software (FlowJo, USA).

2.5. Differentiation into Mesenchymal Lineages

TAD and ALPL+ cells were evaluated by inducing their differentiation into adipocytes, osteoblasts and chondroblasts, as previously described [2]. Cells between passages 2 and 6 were incubated with control maintenance medium or differentiation induction medium for 21 days. Cells were then fixed for morphological evaluation by standard staining procedures, with Oil Red for adipogenesis, Von Kossa staining for osteogenesis and toluidine blue staining for chondrogenesis [2]. We also performed RT-qPCR to estimate the level of differentiation-specific mRNA in induced TAD and ALPL+ cells. We analyzed adipogenic differentiation quantitatively, by counting cells from three biological replicates of TAD and ALPL+ cells, with analysis by ImageJ version 1.45d.

2.6. Evaluation of Gene Expression by RT-qPCR

Total RNA was obtained with the RNeasy kit (QIAGEN, USA) and samples were treated 'in column' with DNase I (QIAGEN, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was

synthesized from 1 µg of total RNA, with oligo-dT primers (USB Corporation, USA) and a reverse transcriptase kit (IMPRON II, Promega, USA), according to the manufacturers' instructions. PCR was carried out as previously described [2,25,23]. The primer sets and PCR conditions are listed in Table 1.

2.7. Statistical Analysis

Donor age and total ischemia time are expressed as means ± standard deviation. All other data are expressed as means ± standard error for three or more biological replicates. We used Fisher Exact Test to compare successful cell isolations from auricle or ventricle samples. We used Student's t-test to compare other samples. ($p < 0.05$ considered significant).

3. RESULTS

3.1. Isolation of Human Heart-Derived Cells by Explant Cell Culture

We used the explant cell culture technique to isolate human heart-derived cells from right ventricles or auricles. Samples were obtained from 24 adult cadaveric donors

Table 1. Primer sets

Primer	Sequence (5' - 3')	Size (bp)	Annealing (°C)	Reference
ALPL	Forward: TGGCCCCATGCTGAGTGACAC Reverse: TGGCGCAGGGGCACAGCAGAC	160	55	[2]
FABP4	Forward: ATGGGATGGAAAATCAACCA Reverse: GTGGAAGTGACGCCCTTTCAT	97	60	[2]
CD44	Forward: CCCTCTTGGCCTTGGCTTTGATTC Reverse: TTGAGTCCACTTGGCTTTCTGTCC	133	55	
ACTA2	Forward: CCGGGACATCAAGGAGAACTG Reverse: GGTACATAGTGGTCCCTGATA	277	55	
TGFB1	Forward: CGTGCGGCAGCTGTACATTGACTT Reverse: CGCCCGGTTATGCTGGTTGT	200	55	
CAD11a	Forward: TCACACTGACCTCGACAGATTTT Reverse: AGGGGGTAGGCTGAAGATAA	331	55	
FSP1	Forward: TCGGGCAAAGAGGGTGACAAGTT Reverse: ATGGCGATGCAGGACAGGAAGAC	205	55	
ABCG2	Forward: ACCATTGCATCTTGGCTGTC Reverse: CGATGCCCTGCTTTACCAA	233	55	[21]
Col1a	Forward: GGCCATCCAGCTGACCTTCC Reverse: CGTGACGCCATCGACAGTGAC	205	60	
Col2	Forward: CCGGGCAGAGGGCAATAGCAGGT Reverse: CAATGATGGGGAGGCGTGAG	128	60	[2]
GATA4	Forward: CTCCCCTGGCAAAACAAGAG Reverse: TGCCGTGCTTAGCAGTCGT	422	62	[22]
CD117	Forward: CATAATGAAGACTTGTGGGATGC Reverse: CACGGCTTCTGTGGTTGG	148	55	
TNNT2	Forward: AGGAGAAAGTTCAAGCAGCAGA Reverse: GCGAGCGAGGAGCAGAT	155	55	[23]
VEGFA	Forward: CTACCTCCACCATGCCAAGTG Reverse: TGGCTGATAGACATCCATGA	101	60	[23]
GAPDH	Forward: GGCATGCTGGCGCTGAGTAC Reverse: TGGTTACACCCATGACGA	150	60	[2]
RNApol IIa	Forward: TACCACGTATCTCCTTTGATGGCT Reverse: GTGGGGCTGCTTCCATAA	187	60	[24]

with a mean total ischemia time of 21.5 ± 9.1 hours (range: 2.5 to 41.8 hours). We have not found significant statistical difference when comparing ischemia time and successful and not successful cell isolation (data not shown). The mean age of the donors was $39 \text{ years} \pm 12$; 54% ($n = 13$) of the donors were male and 46% ($n = 11$) were female. After two to four weeks of culture, cells began to migrate from the cultured explants of auricle and ventricle tissues (Figures 1(a)-(b)).

Cells were successfully isolated in 14/20 trials for the right auricle (70%) and 7/21 trials for the right ventricle (33%) with a statistical significance of $p < 0.05$. Success rates were similar for cultures of explants from male and female donors. However, we did not find statistical significance when comparing isolation success rates from auricle or ventricle samples and donor age classes. We observed a tendency of successful cell isolation in right ventricle samples from younger donors (Figure 1(c)). Cell isolation success rate from right ventricle samples was 50% for younger donors, but only 17% for older donors. Interestingly, samples from donors between the ages of 31 and 50 gave the highest success rates for cells isolation from right auricle samples. We obtained success rates of 86% for donors aged 31 to 40 years and 100% for donors aged 41 to 50 years. By contrast, success rates were lower (50%) for auricle samples from donors between the ages of 21 and 30 years or between the ages of 51 and 60 years (Figure 1(c)). In addition, for 17 donors, we evaluated the isolation of human heart-derived cells from both the right ventricle and the right auricle. The success rates for isolation were different for the two explants. We were able to establish cell cultures from 12/17 (70%) auricles and 4/17 (23%) ventricles. Thus, the type of tissue used seems to play an important role in determining the success of human heart-derived cell isolation. These data suggest that the total auricle-derived cell population (TAD) may be a more suitable source of heart-derived cells than the population of cells from the right ventricle.

3.2. Auricle- and Ventricle-Derived Cell Cultures are Heterogeneous and Express MSC Markers

We characterized total auricle-derived and total ventricle-derived cell populations by performing RT-PCR and flow cytometry assays. MSC/pericyte markers, such as ALPL, CD44 and alpha smooth muscle actin (ACTA2), were detected in the cell samples by RT-PCR (Figure 2(a)). We also found markers of myofibroblasts, such as transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) and cadherin 11a (Cad11a), and markers for fibroblasts, such as collagen 1a (Col1A) and fibroblast-specific protein 1 (FSP1) (Figure 2(a)). Thus, cell populations derived from auricle

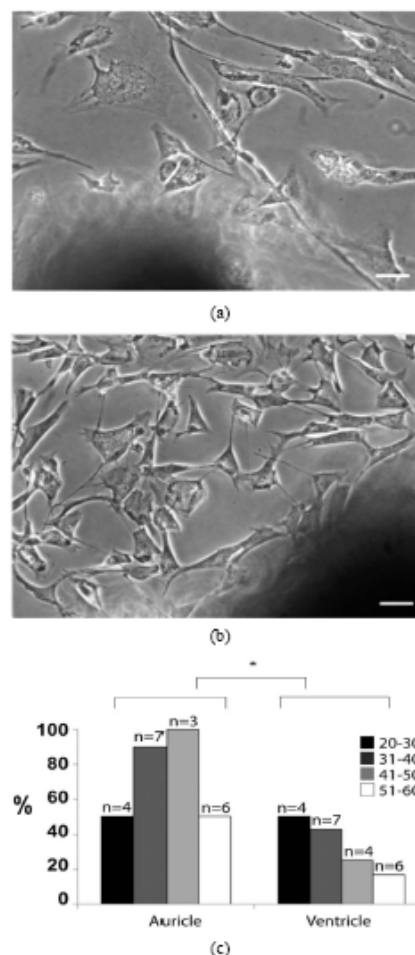


Figure 1. Isolation of cells derived from human heart. Contrast phase microscopy images, showing cells that have migrated from the right auricle (a) and right ventricle (b) after 2 to 4 weeks of primary explant culture. The success rates for the isolation procedure are shown as a function of tissue and donor age (c). Bars indicate age classes. The y axis shows the percentage of successful isolations from auricle or ventricle cardiac muscle for each age class. The n for each age class is indicated at the top of each bar. The calibration bar corresponds to 30 μm . * $p < 0.05$.

or ventricle explant cultures were heterogeneous and RT-PCR found no difference in the profile of marker expression between them.

However, auricle-derived cell population had higher

levels of CD90 and ALPL expression than ventricle-derived cells on flow cytometry, whereas amounts of CD105, CD140b and CD117 were similar in both populations (Figure 2(b)). The auricle-derived cell population may be a more suitable source of heart-derived cells expressing tissue nonspecific alkaline phosphatase than the right ventricle as we found larger amounts of ALPL in auricle samples than in ventricle samples. We therefore used total auricle-derived cells (TAD) for subsequent analyses.

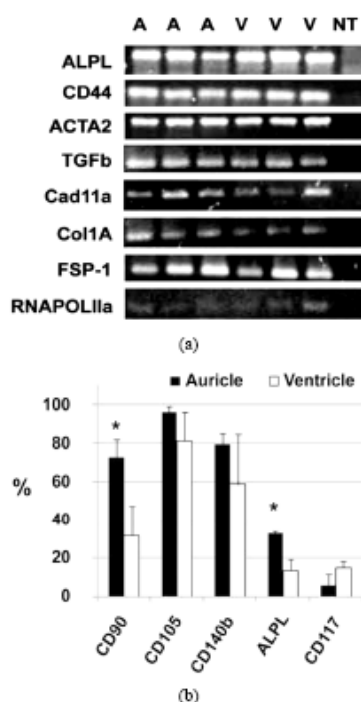


Figure 2. Characterization of auricle-derived and ventricle-derived cell cultures. The expression of markers for MSC/pericytes (ALPL, CD44, ACTA2), myofibroblasts (TGF β , Cad11a) and fibroblasts (FSP-1, colla) and the expression of the housekeeping gene RNA Pol IIa were assayed by RT-PCR, with three independent samples at passage 4. Samples from auricle-derived cell cultures (A) and ventricle-derived cell cultures (V) are shown, NT (non template control) (a). The presence of markers for pericytes (ALPL, CD140b), mesenchymal stem cells (CD90 and CD105) and cardiac progenitor cells (CD117) was analyzed by flow cytometry (b). At least three independent donors were used for each marker. * $p < 0.05$.

3.3. The ALPL+ Cell Population Can be Purified from Total Auricle-Derived cells (TAD) and Has the Characteristics and Differentiation Potential of MSC

Using magnetic microbeads, we obtained a cell population enriched in cells expressing tissue nonspecific alkaline phosphatase (ALPL+). A single round of purification yielded an ALPL+ enriched population of $86.4\% \pm 6.2$ ($n = 3$), as quantified by flow cytometry (Figure 3(a)). We then evaluated markers of MSC, pericytes and endothelium cells. We observed no difference in the expression of MSC/perivascular cell markers, such as CD140b and nestin (Figure 3(b)).

We analyzed the expression of endothelial markers: CD34 was expressed by less than 15% of cells, Von Willebrand factor (vWF) was expressed by less than 10% of cells and other endothelial markers, such as CD133 and CD31, were not detected at all (Figure 3(c)). We then evaluated MSC markers. Both TAD and ALPL+ cells expressed positive markers for mesenchymal stem cells, such as CD90, CD105 and CD73 (Figure 3(d)), and neither of these cell populations expressed negative markers, such as CD45, CD14 and HLA-DR (Figure 3(e)). Thus, these heart-derived cell populations appear to contain MSC-like cells in accordance with criteria pointed out by Dominici *et al.* [20].

Thus, the differentiation of TAD and ALPL+ cells into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts was induced. Both populations were able to differentiate along these three lineages, indicating that MSC-like cells are present in both TAD and ALPL+ cells, as shown by phase-contrast microscopy and cytochemistry (Figure 4 (a)-(b)). The expression of fabp4, collagen 1a and collagen II, lineage-specific markers of adipocytes, osteoblasts and chondroblasts, respectively, was assayed by RT-qPCR (Figure 4(c)). Fabp4, collagen 1a and collagen II mRNA levels were higher in ALPL+ cultures than in TAD cultures ($p < 0.05$).

We analyzed adipogenic differentiation, by staining lipid-rich vacuoles with Oil Red O. We observed such differentiation in $48.5\% \pm 16.1$ of TAD cells and $69.6\% \pm 5.5$ of ALPL+ cells, this difference being non significant. TAD cells had only a few, very small intracellular lipid droplets (Figure 4(b)), whereas ALPL+ cells were large and round, with lipid-rich vacuoles in the cytoplasm (Figure 4(b)). We also evaluated the area, in pixels, covered by lipid-rich vacuoles stained with Oil Red O within an arbitrarily defined region, for three independent donors. The area covered by lipid-rich vacuoles was significantly larger for ALPL+ cells than for TAD (Figure 5). Thus, the adipocytes differentiated in ALPL+ cells were more mature than those in TAD cultures.

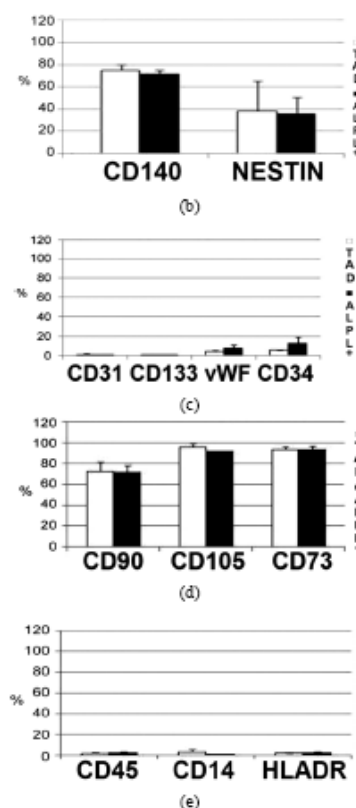
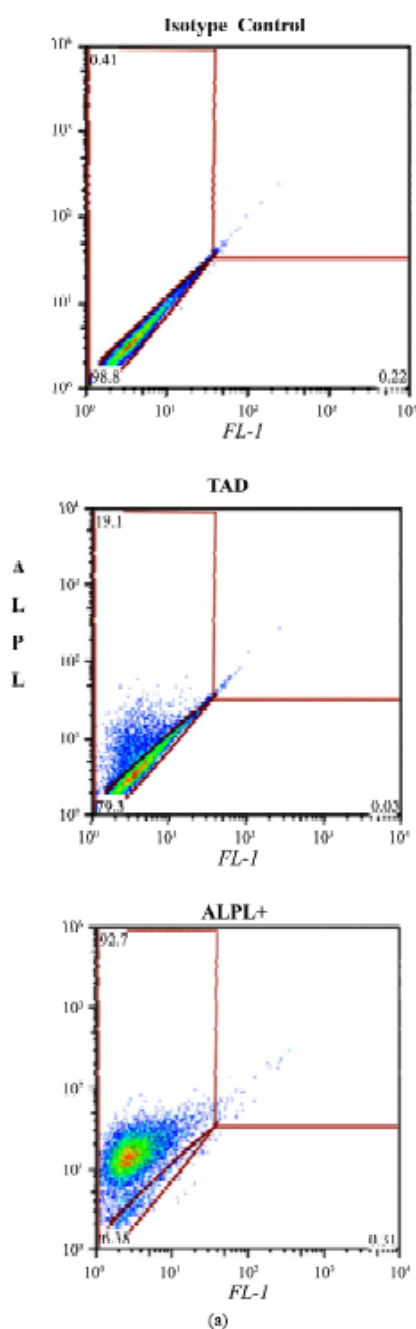


Figure 3. Purification of the ALPL+ population from auricle-derived cell cultures. Isotype control, TAD cells (and the ALPL+ -enriched population after selection on micromagnetic beads and evaluation by flow cytometry, a representative experiment (a). Markers for pericytes (b), Markers for endothelium (c), MSC-positive Markers (d) and MSC-negative markers (e). Immunofenotyping was evaluated in TAD (total auricle-derived cell population), white bars and in ALPL+ cells (tissue nonspecific alkaline phosphatase positive cell population), black bars. Data are expressed as medians and standard error ($n = 3$). Von Willebrand factor (vWF).

3.4. Expression of Cardiac Markers

We evaluated the expression of cardiac markers (Figure 6). Both the TAD and ALPL+ cell populations expressed GATA4, an early cardiomyogenic marker [26], and CD117, a cardiac progenitor marker [27]. We also observed the expression of VEGF, an endothelial growth factor [28]. ALPL+ cells also expressed another marker of cardiac-resident stem cells: the side population marker ABCG2 [29,30]. In addition, these cells expressed cardiac troponin T, another cardiac lineage marker.

4. DISCUSSION

The aim of this study was to isolate ALPL+ cells from human heart samples from a valve bank. We showed that a heart-derived cell population enriched in cells expressing tissue nonspecific alkaline phosphatase had mesenchymal stem cells characteristics such as plastic adherence, antigenic profile and the potential to differentiate into mesenchymal lineages [20]. We also showed that heart-derived ALPL+ cells expressed a repertoire of cardiac markers.

Alkaline phosphatase has been shown to be a marker for MSC in bone marrow, embryonic stem cells, neuronal progenitor cells, myogenic pericytes in human skeletal muscle and endometrial MSC-like cells [12,13,15,17-19]. We investigated ALPL+ cells in human hearts.

In most previous studies, the cardiac progenitor cells

studied were isolated from animal models [31,32] or from fresh material obtained during biopsies on donors with cardiac diseases [27,33]. MSC have also previously been isolated from human heart tissues taken from terminal heart failure patients undergoing heart transplantation [9]. However, heart failure may interfere with the homeostasis of the organ, thus affecting the putative cardiac progenitor population, as demonstrated by Gálvez *et al.* [34]. Taking these facts into account, we decided to investigate whether MSC expressing the ALPL marker could be isolated from human heart samples with no heart condition related to death cause.

In valve banks, hearts are processed for valve extraction and muscle tissue is actually discarded. We evaluated samples with a mean total ischemia time of 21.5 ± 9.1 hours with up to 48 hours elapsing before cell isolation.

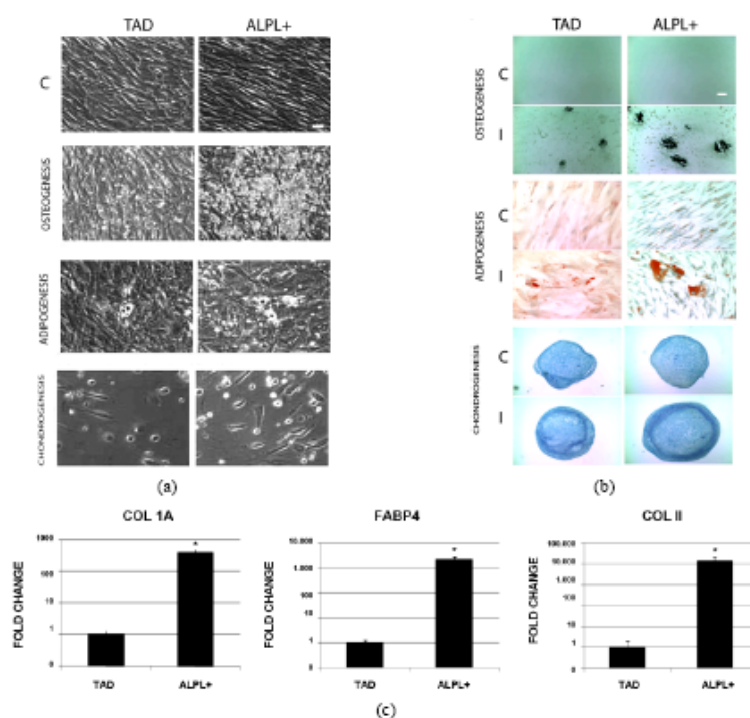


Figure 4. Differentiation into mesenchymal lineages. Differentiation into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts was induced in TAD and ALPL+ cells over a period of 21 days. Phase contrast microscopy images were obtained (a), and cytochemistry evaluations (b) carried out. Gene expression data are shown for the differentiation markers assayed by RT-qPCR (c). Data were collected from 3 donors. Representative data are shown. The calibration bar corresponds to 15 μ m for figure a. The calibration bar for adipogenesis in figure b is 15 μ m, and that for osteogenesis and chondrogenesis in figure b is 60 μ m. Control (C) and induced (I). Fatty acid binding protein 4, adipocyte (Fabp4), collagen 1a (Col 1A) and collagen II (COL II), * $p < 0.05$.

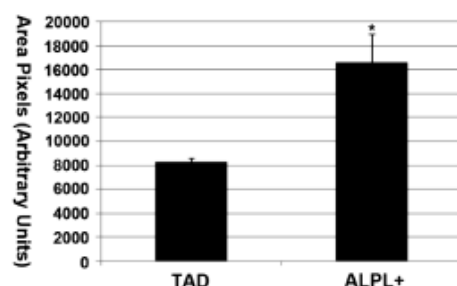


Figure 5. Quantification of the lipid-rich area during adipogenic differentiation. The area covered by lipid-rich vesicles was determined in arbitrary units (pixels). Data were collected from 3 donors ($p < 0.05$ considered significant).

We were able to isolate MSC, by the explant cell culture technique, from the right auricles of human cadaveric donors. ALPL+ cells may constitute a heart-resident population enriched in MSC, as mRNA levels for mesenchymal lineage markers (osteoblasts, adipocytes and chondroblasts) were higher in ALPL+ cells than in TAD cells induced to differentiate. Indeed, larger numbers of adipocytes were found to be differentiating cells than in TAD cells, and ALPL+ cells also had a higher lipid-rich vesicle content. Thus, the tissue discarded by tissue banks may be evaluated as a source of MSC, even after prolonged ischemia.

ALPL expression has been observed in myogenic precursors in skeletal muscle, different from satellite cells [18]. Thus, the ALPL+ cells described here may even resemble the mesoangioblasts described in murine cardiac tissue [32] and in human cardiac tissue from donors with hypertrophic cardiomyopathies [34]. ALPL+ cells may display some commitment to cardiac lineages, as we have shown they express GATA4, a master gene in cardiomyogenic and myocardial differentiation [26], the cardiac resident stem cell marker CD117 [27], ABCG2, a marker of the side population, and a well known marker of stem cells and cardiac stem cells [30], together with the cardiac isoform of troponin T, a marker of the cardiomyocyte lineage.

The expression of these markers may constitute a suitable characteristic for evaluation, as it may be beneficial for cardiac lineage differentiation and for applications in cardiovascular cell therapy. These cells may have several advantages over other adult stem cells, because of their tissue specificity, precommitment and potential autologous use, as suggested for other cardiac progenitor cells [35]. We observed the expression of some cardiac markers in heart-derived MSC in this study. It therefore seems likely that the cardiac niche plays a role in this expression. As pointed out in a review, the stem cell niche is a

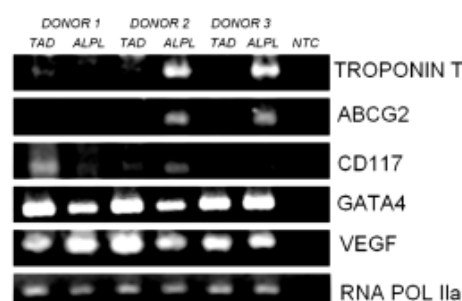


Figure 6. Expression of cardiac markers. The expression of markers for cardiac lineages, such as GATA4, CD117, ABCG2 and cardiac troponin T, the growth factor VEGF and the housekeeping gene RNA Pol IIa was analyzed by RT-PCR for 3 independent samples of TAD cells and ALPL+ cells and a non template control (NTC). The two cell populations had similar expression profiles for VEGF, GATA4 and CD117. ALPL+ cells also expressed troponin T and ABCG2 in 2 of the 3 samples analyzed.

complex, multifactorial local micro-environment [36].

The auricle appeared to be the most appropriate source of heart-derived cells. The success rate for cell isolation by explant culture was higher for auricle-derived cells than for ventricle-derived cells. This may reflect differences in the responses to ischemia of the two types of tissue. As previously reported for experimental models, the changes induced by ischemia in atrial muscle cells occur more slowly than those induced in ventricular muscle cells, and tissue autolysis is also slower [37,38].

By contrast to our isolation of ALPL+ cells from human heart samples, a previous study reported an absence of ALPL detection in MSC from human hearts [39]. These conflicting findings may reflect differences in isolation and culture procedures. Here, we isolated cells by the explant cell culture technique, which may have favored the isolation of ALPL+ cells, and we used a medium described for the isolation of pericytes from human muscle tissue [18]. Cell culture enhances alkaline phosphatase expression in pericytes isolated from mammalian hearts [40]. We may therefore have favored the isolation of human heart pericytes, by selecting tissue non-specific alkaline phosphatase-expressing cells from an explant cell culture. By contrast, in the other study, cells were obtained by enzymatic digestion of heart samples from donors with heart failure [39].

The yields of the explant culture method were compatible with successful use in basic research. However, they remained below 100%, and further evaluations are required before this method can be considered for clinical use in autologous therapy. Furthermore, it takes

about two to four weeks to isolate the first cells and, as reported here, yield varies with donor age. However, the explant cell culture method is simple, inexpensive and could be easily adapted for cell isolation from material provided by tissue banks, for obtaining heart-derived cells.

In summary, tissue and cell banks now provide hope for improvements in the quality of life of people in need of cell or tissue transplantation. In the future, allogeneic cell banks for cell therapy should be evaluated, as proposed by Pasquini et al. [41]. If a heart-derived cell bank could be established, this might make it easier to obtain material for cell-based therapies on the basis of a histocompatibility match. This work provides new insight into possible sources and strategies for obtaining cells and making them available for cell therapy.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Alyne Rocha Trigo, Andressa Vaz Schittini, Jaiesy Zych, Nilson Fidencio and Patricia Shigunov for technical support. We also thank all the staff of Instituto Carlos Chagas-Fiocruz Paraná for laboratory and administrative support and the staff of *Banco de Homocertos Cardíacos Humanos* for tissue collection. We thank Itamar Crispin for graphic design. We thank Hugo Naya from Pasteur Institute, Montevideo for statistical analysis. This study was supported by Fundação Oswaldo Cruz, PAPER V (Grant number 0232 to AC), Decit/SCTIE/MS, by CNPq and Fundação Araucária (Grant number 202/2010 to SG), SETI/Fundação Araucária (Grant number 480/2010 to AMA). AC holds a FINEP/CNPq fellowship, SG and BD are research fellows at the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*-CNPq. The authors report no potential conflicts of interest or financial interests.

REFERENCES

- [1] Gimble, J. and Guilak, F. (2003) Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. *Current Topics in Developmental Biology*, 58, 137-160. doi:10.1016/S0070-2153(03)58005-X
- [2] Rebelatto, C., et al. (2008) Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 901-913. doi:10.3181/0712-RM-356
- [3] Makino, S., et al. (1999) Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *Journal of Clinical Investigation*, 103, 697-705. doi:10.1172/JCI75298
- [4] Tomita, Y., et al. (2007) Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: Current status and problems to be solved. *Medical and Biological Engineering & Computing*, 45, 209-220. doi:10.1007/s11517-007-0163-4
- [5] Toma, C., Pittenger, M., Cahill, K., Byrne, B. and Kessler, P. (2002) Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105, 93-98. doi:10.1161/hc0102.101442
- [6] Pittenger, M., et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143
- [7] Zuk, P., et al. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 4279-4295. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105
- [8] Rogers, I. and Casper, R. (2004) Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract Res Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 18, 893-908. doi:10.1016/j.bpobgyn.2004.06.004
- [9] Beltrami, A., et al. (2007) Multipotent cells can be generated *in vitro* from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood*, 110, 3438-3446. doi:10.1182/blood-2006-11-055566
- [10] Crisan, M., et al. (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3, 301-313. doi:10.1016/j.stem.2008.07.003
- [11] Dominici, M., et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-317. doi:10.1080/14653240600855905
- [12] Battula, V., et al. (2009) Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica*, 94, 173-184. doi:10.3324/haematol.13740
- [13] Sobiesiak, M., et al. (2009) The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is identical to tissue non-specific alkaline phosphatase. *Stem Cells and Development*, 19, 669-677. doi:10.1089/scd.2009.0290
- [14] Mornet, E., et al. (2001) Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 31171-31178. doi:10.1074/jbc.M102788200
- [15] O'Connor, M., et al. (2008) Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26, 1109-1116. doi:10.1634/stemcells.2007-0801
- [16] Adewumi, O., et al. (2007) Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature Biotechnology*, 25, 803-816. doi:10.1038/nbt1318
- [17] Langer, D., Ikebara, Y., Takebayashi, H., Hawkes, R. and Zimmermann, H. (2007) The ectonucleotidases alkaline phosphatase and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 are associated with subsets of progenitor cell populations in the mouse embryonic, postnatal and adult neurogenic zones. *Neuroscience*, 150, 863-879. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.07.064
- [18] Dellavalle, A., et al. (2007) Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nature Cell Biology*, 9, 255-267. doi:10.1038/ncb1542
- [19] Schwab, K. and Gargett, C. (2008) Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Human Reproduction*, 22, 2903-2911. doi:10.1093/humrep/dem265

- [20] Crisan, M., Corselli, M., Chen, C.W. and Péault, B. (2011) Multilineage stem cells in the adult: A perivascular legacy? *Organogenesis*, 7, 101-104. doi:10.4161/org.7.2.16150
- [21] Chen, Z., Evans, W., Pflugfelder, S. and Li, D. (2006) Gap junction protein connexin 43 serves as a negative marker for a stem cell-containing population of human limbal epithelial cells. *Stem Cells*, 24, 1265-1273. doi:10.1634/stemcells.2005-0363
- [22] Yoon, B., et al. (2006) Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment. *Differentiation*, 74, 149-159. doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00063.x
- [23] Schittini, A., et al. (2010) Human cardiac explant-conditioned medium: Soluble factors and cardiomyogenic effect on mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 235, 1015-1024. doi:10.1258/ebm.2010.010003
- [24] Shigunov, P., et al. (2011) PUMILIO-2 I is involved in the positive regulation of cellular proliferation in human adipose-derived stem cells. *Stem Cells and Development*, In Press. doi:10.1089/scd.2011.0143
- [25] Rebelatto, C., et al. (2009) Expression of cardiac function genes in adult stem cells is increased by treatment with nitric oxide agents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378, 456-461. doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.061
- [26] Kelley, C., Blumberg, H., Zou, L.I. and Evans, T. (1993) GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. *Development*, 118, 817-827.
- [27] Bearzi, C., et al. (2007) Human cardiac stem cells. *Proceedings of the National Academy Science of the USA*, 104, 14068-14073. doi:10.1073/pnas.0706760104
- [28] Formiga, F., et al. (2010) Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model. *Journal of Controlled Release*, 147, 30-37. doi:10.1016/j.jconrel.2010.07.097
- [29] Hierlihy, A., Seale, P., Lobe, C., Rudnicki, M. and Megeney, L. (2002) The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Letters*, 530, 239-243. doi:10.1016/S0014-5793(02)03477-4
- [30] Yamahara, K., et al. (2008) Heterogeneous nature of adult cardiac side population cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371, 615-620. doi:10.1016/j.bbrc.2008.04.021
- [31] Beltrami, A., et al. (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114, 763-776. doi:10.1016/S0092-8674(03)00687-1
- [32] Galvez, B., et al. (2008) Cardiac mesoangioblasts are committed, self-renewable progenitors, associated with small vessels of juvenile mouse ventricle. *Cell Death and Differentiation*, 15, 1417-1428. doi:10.1038/cdd.2008.75
- [33] Messina, E., et al. (2004) Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circulation Research*, 95, 911-921. doi:10.1161/01.RES.0000147315.71699.51
- [34] Galvez, B., et al. (2009) Human cardiac mesoangioblasts isolated from hypertrophic cardio-myopathies are greatly reduced in proliferation and differentiation potency. *Cardiovascular Research*, 83, 707-716. doi:10.1093/cvr/cvp159
- [35] Bollini, S., Smart, N. and Riley, P. (2010) Resident cardiac progenitor cells: At the heart of regeneration. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50, 296-303. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.07.006
- [36] Becerra, J., Santos-Ruiz, L., Andrade, J.A. and Mari-Beffa, M. (2011) The stem cell niche should be a key issue for cell therapy in regenerative medicine. *Stem Cell Reviews*, 7, 248-255. doi:10.1007/s12015-010-9195-5
- [37] Armiger, L.C., Fitzgerald, S., Vanderwee, M.A., Gavin, J.B. and Herdson, P.B. (1981) The effects of altered cation balance on the fine structure of hypoxic myocardial cells. *Pathology*, 13, 449-461. doi:10.3109/00313028109059063
- [38] Armiger, L.C., Seelye, R.N., Morrison, M.A. and Holliss, D.G. (1984) Comparative biochemistry and fine structure of atrial and ventricular myocardium during autolysis *in vitro*. *Basic Research in Cardiology*, 79, 218-229. doi:10.1007/BF01908308
- [39] Riekstina, U., et al. (2009) Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Reviews*, 5, 378-386. doi:10.1007/s12015-009-9094-9
- [40] Lindner, H., et al. (1998) Loss of myocardial capillary endothelial-cell alkaline phosphatase (ALP) activity in primary endothelial cell culture. *Cell and Tissue Research*, 291, 497-505. doi:10.1007/s004410051019
- [41] Pasquinelli, G., et al. (2007) Thoracic aortas from multior-gan donors are suitable for obtaining resident angiogenic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*, 25, 1627-1634. doi:10.1634/stemcells.2006-0731

ANEXO C



Ato da Diretoria Executiva 060/2010

Chamada de Projetos 14/2009
Programa de Apoio a Pesquisa Básica e Aplicada

A Diretoria Executiva da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná torna público os projetos aprovados no âmbito da Chamada de Projetos 14/2009 - "Programa de Apoio a Pesquisa Básica e Aplicada".

Chamada 14/2009 – Resultado

IES	Proj.	Título do Projeto	Coordenador
Modalidade A			
CIÊNCIAS AGRÁRIAS			
Unicentro	18606	Efeito do alfa tocoferol na imunidade inata sanguínea e da glândula mamária de vacas durante a lactação	Heloisa Godoi Bertagnon
CIÊNCIAS DA SAÚDE			
UTFPR	18193	Nutrição e atividade física no controle do peso corporal	Eliana Ap. Fagundes Queiroz Bortolozo
UEL	18476	Uso da translação para o aleitamento materno de prematuros: ensaio clínico randomizado	Edilaine Giovanini Rossetto
CIÊNCIAS SOCIAIS, HUMANAS E JURÍDICAS			
UEL	16398	A dimensão sócio-histórica e ético-política das Relações Públicas e sua práxis comunitária: uma análise ontológico-propositiva	Regina Célia Escudero César
Unicentro	16449	Monitoramento de processos hidrogeomorfológicos no Sistema de Faxinal Anta Gorda - Prudentópolis - PR	Valdemir Antoneli
Unioeste	18540	As relações de trabalho na perspectiva dos direitos humanos e direitos fundamentais no Brasil	Carolina Spack Kemmelmeier
EDUCAÇÃO E PSICOLOGIA			
Fafiuva	16549	Catálogo e preservação de documentos histórico-educacionais para reconstruir a História da Educação pública em escolas da região de abrangência da FAFIUV- Paraná: 1912 à década de 50.	Márcia Marlene Stentzler Garcia de Lima
ENGENHARIAS			
UTFPR	18431	Avaliação da resistência mecânica à compressão de concreto com o uso da técnica de Tomografia Computadorizada 2 e 3D	José Carlos Alves Galvão
UTFPR	18463	Dosimetria pediátrica periférica em radioterapia de intensidade modulada que emprega blocos compensadores	Danyel Scheidegger Soboll
UFPR	19067	Concreto auto-adensável com emprego de agregado miúdo de resíduo de britagem de rocha: Estudo de viabilidade técnica e econômica	José de Almendra Freitas Jr.
UEL	19142	Novas tecnologias para medição de grandezas agrometeorológicas e quantificação da água no leite para detecção de fraudes	Maria Bernadete de Moraes França
LETRAS E ARTES			
UEPG	19102	Arquivo Alceu Schwab	Rogério de Brito Bergold
QUÍMICA			
UTFPR	18050	Quantificação de colesterol e ácidos graxos em ovos orgânicos e convencionais	Gisely Luzia Stroher
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS			
UEPG	17925	Expressão da metaloproteinase de membrana 1 (MT1-MMP) e do inibidor de metaloproteinase 2 (TIMP-2) em câncer intestinal induzido por droga em ratos adultos	José Rosa Gomes



Apoio ao Desenvolvimento Científico
e Tecnológico do Paraná

UFPR	18477	Monitoramento da qualidade da água em tanques de piscicultura da região oeste do Estado Paraná (Palotina/PR)	Alexandre Leandro Pereira
MULTIDISCIPLINARES			
Unicentro	15148	Efeito no crescimento tumoral, resposta de macrófagos e de linfócitos, em ratos portadores de tumor de Walker 256 suplementados com óleo rico em ácido graxo alfa-linolenico	Dalton Luiz Schiessel
UTFPR	15854	Avaliação da qualidade ambiental, em rios antropizados da região de Campo Mourão-PR, a partir da qualidade da água e da utilização de peixes como bioindicadores ambientais.	Elizabete Satsuki Sekine
ICC	17304	Diferenciação em linhagens mesenquimais de células cardíacas humanas positivas para fosfatase alcalina: aplicação em terapias celulares do sistema cardiovascular	Alessandra Melo de Aguiar
UTFPR	18576	"Do Lixo à Dança: Resgate da Identidade Pessoal e Coletiva dos Catadores de Material Reciclável de Piraquara- PR"	Daniela Isabel Kuhn
UTFPR	18677	Biodigestão anaeróbia da mistura de resíduos avícolas e lácteos	Simone Beux
Modalidade B			
ADMINISTRAÇÃO E ECONOMIA			
Unioeste	5435	Análise da pluriatividade e das rendas não-agrícolas no estado do Paraná	Carlos Alberto Piacenti
Unioeste	18775	Produção de hortaliças orgânicas na microrregião de Toledo - Paraná.	Rúbia Nara Rinaldi
ARQUITETURA E URBANISMO			
UEL	17665	Processo de pesquisa para a elaboração do projeto de arquitetura à programação arquitetônica	César Imai
UFPR	18060	Os sistemas de espaços livres e a constituição da esfera pública contemporânea no Brasil no caso da Região metropolitana de Curitiba, Paraná	Alessandro Filla Rosaneli
CIÊNCIAS AGRÁRIAS			
UTFPR	13980	Estudo da bioatividade do pólen apícola produzido em Mandirituba, PR em função da sazonalidade	Solange Teresinha Carpes
Unioeste	14577	Consequências do aquecimento da água no ciclo reprodutivo de peixes Neotropicais	Éder André Gubiani
Unioeste	14965	Silagem de resíduo úmido de cervejaria na alimentação de bovinos leiteiros	Maximiliane Alavarase Zambom
UTFPR	15471	Caracterização e utilização do okara oriundo de grãos de soja produzidos em diferentes regiões.	Neusa Fátima Seibel
UTFPR	15881	Caracterização de genótipos de cana-de-açúcar na Região Sudoeste do Paraná	Alessandro Jaquiel Wacławovsky
UTFPR	17465	Compostos bioativos em uva orgânica e convencional irradiada e seus sucos	Luciano Lucchetta
UTFPR	17489	Utilização de uréia protegida em sal mineral na suplementação de bovinos de corte em pastagem de Tifton-85	Wagner Paris
UTFPR	17505	Pesos de abate e sistemas de terminação de bezerros da raça Holandês visando a produção de carne de vitelão.	Luís Fernando Glasenapp de Menezes
Unicentro	17578	Monitoramento de estresse em aves e mamíferos: relação entre colesterol e corticosterona sob diferentes condições experimentais.	Giuliana Gelbcke Kasecker Botelho
UTFPR	17690	Avaliação de diferentes densidades em pimenta páprica (<i>Capiscum annuum</i>) E BRS MARI (<i>Capsicum baccatum</i> var. <i>Pendulum</i>) conduzida a campo	Daiva Paulus
UEL	17797	Análise do potencial de risco zoonótico de <i>escherichia coli</i> patogênicas para aves (APEC)	Renata Katsuko Takayama Kobayashi
UTFPR	17840	Desenvolvimento de mudas de espécies florestais nativas e exóticas para reflorestamento com uso de fertilizantes solúveis e de solubilidade controlada	Paulo Sergio Pavinato
UEL	17935	Germinação e emergência de sementes de pitaya	Lúcia Sadayo Assari Takahashi

ANEXO D

Original Research

Are purified or expanded cord blood-derived CD133⁺ cells better at improving cardiac function?

Alexandra C Senegaglia¹, Laura A Barboza¹, Bruno Dallagiovanna², Carlos A M Aita¹, Paula Hansen¹, Carmen L K Rebelatto¹, Alessandra M Aguiar², Nelson I Miyague¹, Patrícia Shigunov², Fabiane Barchiki¹, Alejandro Correa², Marcia Olandoski¹, Marco A Krieger² and Paulo R S Brofman¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Institute for Health and Biological Sciences, Rua Imaculada Conceição, 1155 Curitiba, Paraná, 80215901; ²Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. Rua Prof. Algacyr Munhoz Maeder, 3775 Curitiba, Paraná 81350010, Brazil

Corresponding author: Alexandra C Senegaglia, Rua Guilherme Pugsley 1760, Apartment 501, Curitiba, Paraná, 80620000, Brazil. Emails: alexandra.senegaglia@pucpr.br; acsenegaglia@hotmail.com

Abstract

Endothelial progenitor cells (EPCs), which express the CD133 marker, can differentiate into mature endothelial cells (ECs) and create new blood vessels. Normal angiogenesis is unable to repair the injured tissues that result from myocardial infarction (MI). Patients who have high cardiovascular risks have fewer EPCs and their EPCs exhibit greater *in vitro* senescence. Human umbilical cord blood (HUCB)-derived EPCs could be an alternative to rescue impaired stem cell function in the sick and elderly. The aim of this study was to purify HUCB-derived CD133⁺ cells, expand them *in vitro* and evaluate the efficacy of the purified and expanded cells in treating MI in rats. CD133⁺ cells were selected for using CD133-coupled magnetic microbeads. Purified cells stained positive for EPC markers. The cells were expanded and differentiated in media supplemented with fetal calf serum and basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I and vascular endothelial growth factor (VEGF). Differentiation was confirmed by lack of staining for EPC markers. These expanded cells exhibited increased expression of mature EC markers and formed tubule-like structures *in vitro*. Only the expanded cells expressed VEGF mRNA. Cells were expanded up to 70-fold during 60 days of culture, and they retained their functional activity. Finally, we evaluated the therapeutic potential of purified and expanded CD133⁺ cells in treating MI by intramyocardially injecting them into a rat model of MI. Rats were divided into three groups: A (purified CD133⁺ cells-injected); B (expanded CD133⁺ cells-injected) and C (saline buffer-injected). We observed a significant improvement in left ventricular ejection fraction for groups A and B. In summary, CD133⁺ cells can be purified from HUCB, expanded *in vitro* without losing their biological activity, and both purified and expanded cells show promising results for use in cellular cardiomyoplasty. However, further pre-clinical testing should be performed to determine whether expanded CD133⁺ cells have any clinical advantages over purified CD133⁺ cells.

Keywords: umbilical cord blood, endothelial progenitor cells, transplantation, myocardial infarction

Experimental Biology and Medicine 2010; 235: 119–129. DOI: 10.1258/ebm.2009.009194

Introduction

Reperfusion therapy is associated with significantly reduced mortality rates and improved clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (MI).¹ However, normal angiogenesis is usually unable to supply the greater demand for oxygen and nutrients required following MI. In addition, it is unable to prevent hypertrophied cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling.² Cell therapy may provide a novel therapeutic strategy to modify left

ventricular remodeling processes and prevent postinfarction heart failure.³ Different cell populations have been tested in this regard in both preclinical and clinical settings. Recently, isolated CD34⁺ cells demonstrated increased potency and safety for therapeutic neovascularization after MI, as compared with total mononuclear cells (MNCs).⁴

Endothelial progenitor cells (EPCs) are precursor cells that can differentiate into mature endothelial cells (ECs) and create new blood vessels.⁵ Generally, EPCs can be identified based

ANEXO E

PUMILIO-2 Is Involved in the Positive Regulation of Cellular Proliferation in Human Adipose-Derived Stem Cells

Patrícia Shigunov,¹ Jose Sotelo-Silveira,²⁻⁴ Crisciele Kuligovski,¹ Alessandra Melo de Aguiar,¹ Carmen K. Rebelatto,⁵ José A. Moutinho,⁶ Paulo S. Brofman,⁵ Marco A. Krieger,¹ Samuel Goldenberg,¹ David Munroe,² Alejandro Correa,¹ and Bruno Dallagiovanna¹

Stem cells can either differentiate into more specialized cells or undergo self-renewal. Several lines of evidence from different organisms suggest that these processes depend on the post-transcriptional regulation of gene expression. The presence of the PUF [Pumilio/FBF (fem-3 binding factor)] domain defines a conserved family of RNA binding proteins involved in repressing gene expression. It has been suggested that a conserved function of PUF proteins is to repress differentiation and sustain the mitotic proliferation of stem cells. In humans, Pumilio-2 (PUM2) is expressed in embryonic stem cells and adult germ cells. Here we show that PUM2 is expressed in a subpopulation of adipose-derived stem cell (ASC) cultures, with a granular pattern of staining in the cytoplasm. Protein levels of PUM2 showed no changes during the differentiation of ASCs into adipocytes. Moreover, RNAi knockdown of *pum2* did not alter the rate of adipogenic differentiation compared with wild-type control cells. A ribonomic approach was used to identify PUM2-associated mRNAs. Microarray analysis showed that PUM2-bound mRNAs are part of gene networks involved in cell proliferation and gene expression control. We studied *pum2* expression in cell cultures with low or very high levels of proliferation and found that changes in *pum2* production were dependent on the proliferation status of the cell. Transient knockdown of *pum2* expression by RNAi impaired proliferation of ASCs in vitro. Our results suggest that PUM2 does not repress differentiation of ASCs but rather is involved in the positive control of ASCs division and proliferation.

Introduction

STEM CELLS CAN EITHER differentiate into more specialized cells or renew themselves. Self-renewal ensures the maintenance and supply of an adult population of undifferentiated stem cells. Many adult tissues contain populations of stem cells that can renew themselves and repopulate damaged tissues after trauma, disease, or aging [1]. Mesenchymal stem cells (MSCs) are present in many tissues and represent a candidate population for cell-based treatments of injured tissues [2]. However, MSCs account for only a very small fraction of the total population of cells present in adult tissues, and therefore in vitro expansion is required before cell therapy [3]. Unfortunately, stem cells senesce during culture and with increasing numbers of passages, and lose their potential to differentiate under these conditions [2,4]. Large numbers of passages also have an adverse affect on MSC activation and cardio protection [5]. An understanding of the biological basis

of self-renewal is essential to determine the mechanisms that maintain and control the propagation of MSCs in an undifferentiated state with no loss of differentiation potential [6].

Gene expression is regulated at various complementary levels, to gain tight control of transcript abundance and translation. Several lines of evidence from different organisms suggest that stem cell self-renewal also depends on post-transcriptional mechanisms of protein translational control [7,8]. This post-transcriptional regulation is mediated by various molecules, including noncoding RNAs and RNA-binding proteins (RBPs) [9]. RBPs can recognize and bind sequences or structural elements present mostly in the untranslated regions (UTRs) of the mRNA and may be classified into families on the basis of their RNA recognition domains [10].

The presence of the PUF (Pumilio/FBF [fem-3 binding factor]) domain defines a family of conserved proteins found in all eukaryotes. The proteins of the PUF family are

¹Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco, Instituto Carlos Chagas, Curitiba, Brazil.

²Advanced Technology Program, Laboratory of Molecular Technology, SAIC-Frederick, Inc., NCI-Frederick, Frederick, Maryland.

³Department of Genetics, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

⁴Department of Cell and Molecular Biology, School of Sciences, Udelar, Montevideo, Uruguay.

⁵Núcleo de Cardiomioplasia Celular, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil.

⁶Instituto de Medicina e Cirurgia do Paraná, Curitiba, Brazil.

ANEXO F



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental and Molecular Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexmp

Transplantation of SNAP-treated adipose tissue-derived stem cells improves cardiac function and induces neovascularization after myocardium infarct in rats

Gel R.M. Berardi^a, Carmen K. Rebelatto^a, Heloísa F. Tavares^b, Max Ingberman^c, Patrícia Shigunov^d, Fabiane Barchiki^a, Alessandra M. Aguiar^d, Nelson I. Miyague^a, Julio C. Francisco^b, Alejandro Correa^d, Alexandra C. Senegaglia^a, Paula Hansen Suss^a, José A. Moutinho^a, Vanessa S. Sotomaíor^b, Lia S. Nakao^{b,c,*}, Paulo S. Brofman^a

^a Núcleo de Tecnologia Celular Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba 80215-901, Brazil

^b Núcleo de Investigação Molecular Avançada Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba 80215-901, Brazil

^c Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Brazil

^d Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Rua Alcayrê Munhoz Mader 3775, Curitiba 81350-010, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 August 2010

Available online 25 November 2010

Keywords:

Adipose-derived stem cells

SNAP

Nitric oxide

Ejection fraction

Neovascularization

Cardiomyogenesis

ABSTRACT

Stem cell therapy has been considered a promise for damaged myocardial tissue. We have previously shown that S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP) increases the expression of several muscular markers and VEGF in mesenchymal stem cells, indicating that transplantation of SNAP-treated cells could provide better functional outcomes. Here, we transplanted SNAP-treated adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) in rat infarcted myocardium. After 30 days, we observed a significant improvement of the ejection fraction in rats that received SNAP-treated ADSCs, compared with those that received untreated cells ($p=0.008$). Immunohistochemical reactions showed an increased expression of troponin T-C and von Willebrand factor, and organized vascular units in the infarcted area of tissue transplanted with treated ADSCs. SNAP exposure induced intracellular S-nitrosation, a decreased GSH/GSSG ratio, but did not increase cGMP levels. Collectively, these results indicate that SNAP alters the redox environment of ADSCs, possibly associated with a pre-differentiation state, which may improve cardiac function after transplantation.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Heart failure is the main cause of hospitalization in the United States. Despite the decline of mortality its prevalence continues to increase, mainly due to effectiveness of clinical treatment and aging of the population (Schocken et al., 2008).

In recent years several studies have demonstrated the potential of stem cells in tissue regeneration with the possibility of cardiac function improvement after transplantation (Al-Radi et al., 2003; Anversa et al., 2003; Orlic et al., 2002; Pittenger et al., 1999; Pittenger and Martin, 2004). The mechanisms by which these cells promote repair of myocardial damage are not well known. However, the idea that stem cells could promote myocardium regeneration by means of the transdifferentiation seems insufficient. For this reason complementary mechanisms should be considered such as paracrine events and neovascularization (Korbling and Estrov, 2003).

Conceptually, a variety of stem cells can be used for myocardium regeneration (Boyle et al., 2006). Mesenchymal stem cells (MSCs) were first described by Friedenstein et al. (1970). Their main function is maintenance and renewal of adult mesenchymal tissue. These cells can be harvested from diverse sources (Fukuda, 2005; Korbling and Estrov, 2003; Wollert and Drexler, 2005) and although the similarities described, differences in the expression of some genes and in differentiation potential (Dominici et al., 2006; Rebelatto et al., 2008) should be considered to choose the best source for each determined transplant (Dai et al., 2005).

Adipose-derived stem cells (ADSCs) show similar characteristics to bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs). Furthermore, they are easily obtained, are present at a high frequency (0.5%), and are able to differentiate into various lineages (Zuk et al., 2002). Planat-Benard et al. (2004) observed that these cells can spontaneously differentiate and express transcription factors of cardiac cells. The ADSCs also express cardiac tissue proteins and have the ability to repair myocardial infarction (Strem et al., 2005), emphasizing the possibility of their use in cellular therapy (Jiang et al., 2002).

The *in vitro* differentiation of ADSCs in cardiomyocytes requires the addition of an inductive agent of differentiation. Nitric oxide (NO) induces the differentiation of embryonic stem cells in cardiomyocytes (Kanno

* Corresponding author. Departamento de Patologia Básica, room 153, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 81531-980, Brazil. Fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: lia.nakao@ufpr.br (L.S. Nakao).